

Association des cytogénéticiens de langue française	
GUIDE DE BONNES PRATIQUES EN CYTOGÉNÉTIQUE	Version : 4
	Date : 12/03/2020

La version 4 de ce guide a été révisée par :

- Nathalie Auger (Gustave Roussy, Villejuif)
- Carole Barin (CHRU Bretonneau, Tours)
- Anne-Laure Bauduin (CHU de Nantes)
- Izabel Bernicot (CHU de Montpellier)
- Audrey Bidet (CHU de Bordeaux)
- Chrystèle Bilhou-Nabera (Hôpital Saint Antoine, Paris)
- Pascale Cervera (Hôpital Saint Antoine, Paris)
- Elise Chapiro (Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris)
- Marie-Agnès Collonge-Rame (CHU de Besançon)
- Charles Coutton (CHU de Grenoble)
- Wendy Cucuini (Hôpital Saint-Louis, Paris)
- Martine Doco-Fenzy (CHU de Reims)
- Nathalie Douet-Guilbert (CHRU Brest, Hôpital Morvan, Brest)
- Jean-Michel Dupont (Groupe Hospitalier Universitaire Paris Centre - Site Cochin, Paris)
- Vincent Gatinois (Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier)
- Philippe Gosset (CHU de Strasbourg)
- Nicolas Gruchy (CHU de Caen)
- Sophie Kaltenbach (Hôpital Necker, Paris)
- Stephan Kémény (Laboratoire Gen-Bio, Clermont-ferrand)
- Pascale Kleinfinger (Laboratoire Cerba)
- Marina Lafage (Hôpital Timone Enfant, Marseille)
- Christine Lefebvre (CHU de Grenoble)
- Philippe Lochu (Laboratoire Gen-Bio, Clermont-ferrand)
- Isabelle Luquet (CHU de Toulouse)
- Chantal Missirian (Hôpital Timone Enfant, Marseille)
- Kamran Moradkhani (CHU de Nantes)
- Frédéric Morel (CHU de Brest)
- Nathalie Nadal (CHU Dijon)
- Caroline Schuth Bolard (CHU de Lyon)
- Christine Terre (Hôpital du Chesnay)
- Alexander Valent (Gustave Roussy, Villejuif)
- Reda Zenagui (CHU de Montpellier)

L'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF) :
 Le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH)
 Le Groupe Français de Cytogénétique constitutionnelle (GFCC)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	7
DÉFINITIONS.....	7
DOMAINES DE COMPÉTENCE DE LA CYTOGÉNÉTIQUE MÉDICALE	8
I. PARTIE COMMUNE À TOUS LES SECTEURS.....	9
A. ENVIRONNEMENT RÉGLEMENTAIRE	9
1. LOIS ET DÉCRETS DE RÉFÉRENCE	9
2. NORME NF EN ISO 15189 et GBEA.....	10
3. DOCUMENTATION DU COFRAC.....	10
4. AUTRES TEXTES CONSULTÉS	10
5. NOMENCLATURE DES ACTES DE CYTOGÉNÉTIQUE	11
5.1. Caryotype constitutionnel prénatal	11
5.2. Caryotype constitutionnel postnatal	11
5.3. Cytogénétique conventionnelle acquise	11
5.4. Actes de cytogénétique moléculaire.....	12
5.5. Actes de culture cellulaire	12
5.6. Dépistage des anomalies chromosomiques par ADNlc.....	13
5.7. Nomenclature des actes HN	13
B. CONDITIONS PRATIQUES DE RÉALISATION DES ACTES DE CYTOGÉNÉTIQUE	13
1. PERSONNEL	13
1.1. Biologistes/ Responsables	14
1.2. Personnel technique	14
1.3. Personnel médico-administratif	14
2. LOCAUX	14
3. INFORMATIQUE.....	15
4. MATERIEL OBLIGATOIRE SPÉCIFIQUE A LA CYTOGENETIQUE	15
5. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES	16
5.1. Prélèvements.....	16
5.2. Identification des prélèvements et informations à fournir.....	16
5.3. Transport	17
5.4. Réception des prélèvements.....	17
6. PROCESSUS ANALYTIQUE	17
6.1. Cytogénétique conventionnelle	17
6.1.1. Culture	17

6.1.2. Marquage en bandes	17
6.2. FISH	18
6.2.1. Conditions d'application.	19
6.2.2 types de sondes.....	19
6.2.3. Validation technique des sondes.....	19
6.2.4. Utilisation des sondes	20
6.2.4.1. Modalité de lecture.....	20
6.2.4.2. Conditions d'interprétation du signal	20
6.2.5. Robustesse des sondes.....	20
6.2.6. Règles d'utilisation des techniques de cytogénétique moléculaire	21
6.3. ACPA.....	22
6.4. ADNlc	22
6.5. Génétique moléculaire appliquée à la cytogénétique	22
7. RÉSULTATS	22
7.1. Informations requises sur le compte-rendu	22
7.2. La formulation des résultats	23
7.3. En l'absence d'anomalie observée.....	23
7.4 Résultat FISH	24
8. DÉLAI DE RÉPONSE ET ÉCHECS	25
9. CONSERVATION DE DONNÉES : SAUVEGARDE ET ARCHIVAGE.....	25
9.1. Documents administratifs et comptes rendus de résultats.....	25
9.2. Documents techniques et matériels biologiques	26
9.2.1. Images.....	26
9.2.2. Lames.....	26
9.2.3. Données bio-informatiques	26
9.2.4. Matériel Biologique	26
10. EVALUATION DE LA QUALITÉ	27
10.1. Indicateurs de qualité	27
10.2. Evaluation externe de la qualité	27
II. CYTOGÉNÉTIQUE CONSTITUTIONNELLE POST-NATALE	28
1. AUTORISATION ET AGRÉMENT	28
1.1. Autorisation de la structure	28
1.2. Agrément du biologiste	28
1.3. Déclaration des cytogénéticiens.....	28
2. INFORMATION ET CONSENTEMENT DES PATIENTS.....	29
3. ECHANTILLONS.....	29
3.1. Prélèvement.....	29

3.2. Identification et indications	29
4. EXAMEN CYTOGÉNÉTIQUE	30
4.1. Culture	30
4.2. Marquage en bandes	30
4.3. Nombre de cellules examinées	30
4.4. Recommandations en cas remaniement de structure non récurrent	30
5. CAS PARTICULIERS	31
5.1. Découverte d'une mosaïque	31
5.2. Chromosomes surnuméraires	32
5.3. Les transfusions sanguines et greffes de cellules souches hématopoïétiques	32
5.4. Patient avec déficit immunitaire et/ou lymphopénie	32
5.5. Les variants hétérochromatiques	32
5.6. Les variants euchromatiques	33
5.7. Les sites fragiles	33
5.8. Les syndromes d'instabilité chromosomique et les maladies cassantes	33
5.9. Les fibroblastes	33
6. HYBRIDATION IN SITU	33
7. ACPA	34
8. TECHNIQUES DE GENETIQUE MOLECULAIRE APPLIQUEE A LA CYTOGÉNÉTIQUE	34
9. RÉSULTATS	34
III. CYTOGÉNÉTIQUE CONSTITUTION-NELLE PRÉNATALE	36
1. AUTORISATION ET AGREMENT	36
2. INFORMATION ET CONSENTEMENT DE LA PATIENTE	36
3. ECHANTILLONS	37
3.1. Prélèvement	37
3.2. Identification et information	37
4. EXAMEN CYTOGÉNÉTIQUE	37
4.1. Avant Culture	37
4.2. Culture	37
4.3. Marquage en bandes	38
4.4. Liquide Amniotique (Conditions optimales)	38
4.5. Villosités Chorales (Conditions optimales)	39
4.6. Sang Fœtal (Conditions optimales)	39
4.7. Mosaïque	40
5. ANALYSE PAR FISH OU AUTRES TECHNIQUES DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE (QF-PCR, QMPSF, ADNlc...) OU PAR ACPA	40
6. RECOMMANDATIONS EN CAS D'ANOMALIE DE STRUCTURE	41

7. DISOMIE UNIPARENTALE	41
8. RÉSULTATS	41
IV. CYTOGENETIQUE HEMATOLOGIQUE	43
A. INTRODUCTION	43
B. CONDITIONS D'EXERCICE	43
C. RÉALISATION DES EXAMENS	43
1. PRÉLÈVEMENT, ACHEMINEMENT ET RÉCEPTION DES ÉCHANTILLONS.....	43
1.1. Prélèvement.....	43
1.2. Fiche de renseignements.....	44
1.3. Réception	44
2. EXAMEN CYTOGÉNÉTIQUE	44
2.1. Cytogénétique conventionnelle	44
2.1.1. Culture	44
2.1.2. Analyse.....	44
2.1.2.1. Au diagnostic	44
2.1.2.2. Lors du suivi.....	45
2.1.2.3. Non réalisation de l'analyse	45
2.1.3. Interprétation de l'analyse cytogénétique	45
2.1.4. Conservation des culots cytogénétiques	45
2.2. Cytogénétique moléculaire.....	45
2.2.1. Conditions générales	46
2.2.2. Modalités d'interprétation des techniques	46
2.2.3. Archivage et stockage.....	47
2.2.4. Détermination du seuil de positivité technique d'une sonde (sensibilité analytique)	47
2.2.5 La validation des sondes	47
3. RÉSULTATS	47
3.1. La formulation des résultats	47
3.2. Les commentaires et la conclusion	48
3.3. Les points particuliers	48
4. DÉLAI DE RÉPONSE.....	49
5. ECHECS	49
6. PARTICULARITÉS SELON LA PATHOLOGIE	49
6.1. Mise en culture	49
6.2. Indication de l'analyse cytogénétique conventionnelle et moléculaire	49
6.3. Cytogénétique du myélome multiple	50

V. HYBRIDATION IN SITU SUR COUPE REALISEE APRES INCLUSION EN PARAFFINE ou CRYOCOUCPE	51
A. INTRODUCTION	51
B. CONDITIONS D'EXERCICE	51
C. RÉALISATION DES EXAMENS sur FFPE	51
1. MATERIEL	51
1.1. Pré-requis pré-analytique.....	51
1.1.1. Préparation des blocs	51
1.1.2. Les coupes	52
2. LA TECHNIQUE.....	52
2.1. Le déparaffinage et le prétraitement	52
2.2. Les sondes	52
3. LECTURE ET INTERPRETATION	52
3.1. Lecture.....	52
3.2. Interprétation.....	53
D. RÉALISATION DES EXAMENS sur CRYOCOUPES.....	53
1. MATERIEL	53
2. LA TECHNIQUE.....	53
3. LECTURE ET INTERPRETATION.....	53
E. ARCHIVAGE et COMPTE-RENDU.....	53
VI CYTOGENETIQUE SUR SPERME (Sperm-FISH) A VENIR	55
VII CYTOGENETIQUE EN DIAGNOSTIC PRE-IMPLANTATOIRE	56

ANNEXES.

ANNEXE 1 : EVALUATION DE LA RÉOLUTION OBTENUE

ANNEXE 2 : INDICATIONS DU CARYOTYPE ET DE L'ACPA EN CYTOGÉNÉTIQUE CONSTITUTIONNELLE POSTNATALE

ANNEXE 3 : EXCLUSION DES MOSAÏQUES

ANNEXE 4 : STRATÉGIE D'ÉTUDE D'UNE MOSAÏQUE EN PRÉNATAL

ANNEXE 5 : RECOMMANDATIONS POUR LA MISE EN CULTURE DES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES SELON LE TYPE D'HÉMOPTHIE

ANNEXE 6 : LISTE NON EXHAUSTIVE DES EEQ EXISTANTS EN CYTOGÉNÉTIQUE

INTRODUCTION

Ce Guide de Bonnes Pratiques a pour objectif de présenter les conditions d'exercice et les pratiques techniques recommandées et nécessaires pour aboutir au diagnostic d'anomalies chromosomiques en tenant compte des indications cliniques, des tissus étudiés.

Il sert de document de référence lors de l'expertise de l'EEQ nationale organisée par l'ACLF.

DÉFINITIONS

La Cytogénétique

a pour objet l'étude de la structure et du fonctionnement normal et pathologique des chromosomes (condensation, recombinaison, réparation, ségrégation, transmission) et de la chromatine (organisation et rôle dans la régulation de l'expression des gènes).

La Cytogénétique médicale

a pour but de détecter les anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises grâce à des techniques microscopiques (techniques de bandes, techniques de cytogénétique moléculaire) ou de génétique moléculaire afin d'établir un diagnostic biologique et d'assurer un conseil génétique. Ces anomalies peuvent être de nombre (plus ou moins de 46 chromosomes), de structure (modification dans la succession de plusieurs locus) ou de réparation (cassures chromosomiques).

La Cytogénétique conventionnelle

met en œuvre des techniques de culture cellulaire et microscopiques (techniques de bandes) qui permettent l'établissement du caryotype.

La Cytogénétique moléculaire

est un domaine de la cytogénétique développant des techniques basées sur les homologies de séquence ADN, permettant l'identification spécifique de tout ou partie d'un ou de plusieurs chromosomes (FISH, ACPA, QMPSF...)

La Cytogénomique

regroupe les technologies d'étude pangénomique utilisant l'ADN (ACPA, séquençage haut débit...).

Le dépistage des anomalies chromosomiques fœtales par ADNic

se fait par analyse de l'ADN cytotrophoblastique obtenu à partir du sang maternel. Il s'agit d'un test de dépistage.

DOMAINES DE COMPÉTENCE DE LA CYTOGÉNÉTIQUE MÉDICALE

En plus des compétences requises pour l'exercice de la Biologie Médicale telles que décrites dans la loi N° 2013-442 du 30 Mai 2013 portant réforme de la biologie médicale, le cytogénéticien doit maîtriser les spécificités propres à l'analyse chromosomique.

Pré-analytique

Connaissance des pathologies associées aux anomalies chromosomiques afin d'orienter l'analyse cytogénétique.

Analytique

Choix de la meilleure technique pour répondre à la demande.

Connaissance des limites de chaque technique : méthode validée au sens de la norme NF EN ISO 15189 (§ 5.5.1.3).

Post-analytique

Connaissance de la mécanique chromosomique permettant de donner un conseil génétique adapté.

Connaissances globales de la cytogénétique et de la génétique.

I. PARTIE COMMUNE À TOUS LES SECTEURS

A. ENVIRONNEMENT RÉGLEMENTAIRE

1. LOIS ET DÉCRETS DE RÉFÉRENCE

- Loi [n° 94-653 du 29 juillet 1994](#) relative au respect du corps humain.
- Décret [n° 2000-570 du 23 juin 2000](#) fixant les conditions de prescription et de réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne et de son identification par empreintes génétiques à des fins médicales et modifiant le code de la santé publique.
- Décret [n° 2008-321 du 04 Avril 2008](#) relatif à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou à son identification par empreinte génétique à des fins médicales.
- [Arrêté du 27 novembre 2008](#) fixant la liste des équipements des laboratoires d'analyses de biologie médicale nécessaires à la réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales.
- [Arrêté du 19 février 2010 modifiant l'arrêté du 23 juin 2009](#) relatif à l'information, à la demande et au consentement de la femme enceinte à la réalisation d'une analyse portant sur les marqueurs sériques maternels et à la réalisation du prélèvement et des analyses en vue d'établir un diagnostic prénatal in utero prévues à l'article R. 2131-1 du code de la santé publique.
- [Décret n° 2013-527 du 20 juin 2013](#) relatif aux conditions de mise en œuvre de l'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques à finalité médicale.
- [Arrêté du 8 décembre 2014](#) définissant les règles de bonnes pratiques relatives à la mise en œuvre de l'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques à finalité médicale.
- [L'article L1131-1 du code de la Santé Publique](#) précise les conditions d'information des membres de la famille en cas de découverte d'une anomalie génétique grave.
- [Arrêté du 27 Mai 2013](#) définissant les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales.
- [Loi N° 2013-442 du 30 Mai 2013](#) portant réforme de la biologie médicale.
- [Décret n°2014-32 du 14 janvier 2014](#) relatif aux diagnostics anténataux.
- [Décret 2016-046 du 26 janvier 2016](#) relatif à la biologie médicale.
- [Décret n° 2016-994 du 20 juillet 2016](#) relatif aux conditions d'échange et de partage d'informations entre professionnels de santé et autres professionnels des champs social et médico-social et à l'accès aux informations de santé à caractère personnel.
- [RÈGLEMENT \(UE\) 2016/679 du parlement européen et du conseil du 27 avril 2016](#) relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données, et abrogeant la directive 95/46/CE (règlement général sur la protection des données = RGPD).
- [Décret n°2017-808 du 5 mai 2017](#) relatif à l'introduction dans la liste des examens de diagnostic prénatal des examens de génétique portant sur l'ADN foetal libre circulant dans le sang maternel.
- [Arrêté du 6 mars 2018](#) modifiant l'[arrêté du 25 janvier 2018](#) fixant les recommandations de bonnes pratiques relatives aux modalités de prescription, de réalisation et de communication des résultats des examens de biologie médicale concourant au diagnostic biologique prénatal.
- [Arrêté du 5 mars 2018](#) fixant les conditions de formation et expérience des biologistes médicaux exerçant les activités de diagnostic prénatal.
- [Décret 2018-1046 du 28 novembre 2018](#) relatif au régime d'autorisation des établissements de santé et des laboratoires de biologie médicale pour la pratique du diagnostic prénatal.

- [Arrêté du 14 décembre 2018](#) modifiant l'[arrêté du 23 juin 2009](#) modifié fixant les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatals avec utilisation des marqueurs sériques maternels de trisomie 21

2. NORME NF EN ISO 15189 ET GBEA

- Norme NF EN ISO 15189 : Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence (AFNOR).
- [Arrêté du 26 novembre 1999](#) relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA).

L'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 est obligatoire pour 100 % des examens réalisés par le LBM, au plus tard le 31 octobre 2020. Pour les examens réalisés hors accréditation jusqu'au 31 octobre 2020, le référentiel applicable est le GBEA (cf [arrêté du 27 mai 2013](#) définissant les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales chapitre B).

3. DOCUMENTATION DU COFRAC

- [SH REF 02](#) : Exigences pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189
- [SH REF 05](#) : Règlement d'accréditation
- [SH REF 08](#) : Expression et évaluation des portées d'accréditation
- [SH INF 50](#) : Portées-type d'accréditation
- [GEN REF 11](#) : Règles générales d'utilisation de la marque COFRAC
- [SH GTA 04](#) : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale
- [SH GTA 16](#) : Guide technique d'accréditation de la technologie de séquençage à haut débit (NGS)

4. AUTRES TEXTES CONSULTÉS

Liste non exhaustive des textes pouvant être utiles pour la mise en œuvre des examens de cytogénétique :

- Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM)
- Recommandation de la HAS : Détermination prénatale du sexe fœtal à partir du sang maternel : rapport d'évaluation technologie
- European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. Silva M et al., Eur J Hum Genet. 2019 Jan;27(1):1-16.
- CCMG (Canadian College of Medical Geneticists), 2014 <http://ccmg.medical.org/>
- UKNEQAS : Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance: a common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations European Journal of Human Genetics (2007)
- Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic) European Journal of Human Genetics (2014)
- ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature). Karger, Basel, Shaffer LG, Tommerup N (eds), 2016.
- General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society. 2012

- Specific Constitutional Cytogenetic Guidelines A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society. 2012
- Recommandations du GFCH pour la prise en charge cytogénétique des hémopathies malignes. Annales de Biologie Clinique 2016 Oct 1;74(5):509-595
- European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. Rack et al., Leukemia. 2019 Aug;33(8):1851-1867.
- Recommendations for cytogenomic analysis of hematologic malignancies: comments from the Francophone Group of Hematological Cytogenetics (GFCH). Nguyen-Khac et al. Leukemia. 2019 Dec 20

5. NOMENCLATURE DES ACTES DE CYTOGÉNÉTIQUE

([Chapitre 2 de la NABM](#) et [chapitre 16 de la NABM](#))

5.1. Caryotype constitutionnel prénatal

- **0040** Technique avec incubation sans changement de milieu (villosités choriales, placenta, sang foetal) : **B 850**
- **0041** Technique avec culture (liquide amniotique, culture de villosités choriales): **B1250**

Les cotations des examens 0040 et 0041 ne sont pas cumulables. Les dispositions de l'article 5 des dispositions générales de la nomenclature des actes de biologie médicale sont applicables aux actes 0040 et 0041. Les actes pris en charge doivent répondre à l'une des indications suivantes :

1° grossesse à risque de trisomie 21 foetale après dépistage positif de la trisomie 21 foetale par analyse de l'ADN libre circulant dans le sang maternel, ou femme enceinte pour laquelle un ou deux examens consécutifs de dépistage de la trisomie 21 par l'analyse de l'ADN libre circulant dans le sang maternel n'a pas permis d'obtenir de résultat interprétable selon les dispositions de l'arrêté en vigueur fixant les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatals de la trisomie 21. Le compte-rendu de l'examen du laboratoire est joint à la demande d'entente préalable

2° Grossesse à risque de trisomie 21 foetale égal ou supérieur à 1/50, le risque ayant été estimé selon les dispositions de l'arrêté en vigueur fixant les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatals. Le compte rendu d'examen du laboratoire est joint à la demande d'entente préalable ;

3° Anomalies chromosomiques parentales ;

4° Antécédent, pour le couple, de grossesse(s) avec caryotype anormal ;

5° Signes d'appel échographiques suivants : anomalies morphologiques du fœtus démontrées, internes ou externes, retard de croissance intra-utérin avéré, anomalies de quantité de liquide amniotique. Le compte rendu de l'examen échographique est joint à la demande d'entente préalable ;

6° Age de la femme supérieur ou égal à trente-huit ans à la date du prélèvement, uniquement, à titre exceptionnel, si la patiente n'a pu bénéficier d'aucun des dépistages de la trisomie 21 prévus DPROD/ Dr FS/DbeIK/NA avril 2019 20. par l'arrêté en vigueur fixant les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatals. La demande d'entente préalable devra stipuler la non-réalisation de ces dépistages

5.2. Caryotype constitutionnel postnatal

- **0901** Caryotype sanguin y compris maladies cassantes : **B800**
- **0902** Caryotype sur fibroblastes : **B1200**

Les cotations sont applicables quel que soit le nombre de techniques de marquage en bandes (R, G, Q, C, NOR).

5.3. Cytogénétique conventionnelle acquise

- **0906** Caryotype sur sang périphérique ou prélèvement de moelle osseuse ou tout tissu présumé envahi par des cellules hématopoïétiques malignes (ganglion lymphatique, liquide d'épanchement, rate, foie, peau) : **B800**

Une cotation par patient.

- **0907** Caryotype sur prélèvement de tumeur solide : **B1200**

Cet acte est pris en charge dans les indications suivantes :

- tumeurs à petites cellules rondes (neuroblastome, sarcome d'Ewing, médulloblastomes) ;
- sarcomes ;
- tumeurs embryonnaires et germinales ;
- tumeurs du rein ;
- tumeurs cérébrales.

Une cotation par patient.

5.4. Actes de cytogénétique moléculaire

Ils peuvent être effectués à l'initiative du biologiste pour caractériser, si besoin, une anomalie chromosomique détectée lors de l'examen du caryotype.

En ce qui concerne la cytogénétique constitutionnelle, ces actes de cytogénétique moléculaire peuvent être prescrits d'emblée sur les données cliniques suivantes :

En situation postnatale :

- recherche d'un syndrome de microremaniement chromosomique ;
- diagnostic de sexe chromosomique ;

En période prénatale :

- signe d'appel échographique.
- grossesse à risque de trisomie 21 fœtale après dépistage positif ou femme enceinte pour laquelle le dépistage de la trisomie 21 n'a pas permis d'obtenir de résultat interprétable selon les dispositions de l'arrêté en vigueur fixant les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatals de la trisomie 21.

En ce qui concerne la cytogénétique oncologique, ces actes de cytogénétique moléculaire peuvent être prescrits d'emblée sur les données cliniques suivantes :

- précision ou affirmation d'une anomalie acquise au moment du diagnostic d'une affection maligne ;
- suivi des patients atteints d'affection maligne.

- **0903** Hybridation sur chromosomes métaphasiques **B500**

Pour une sonde avec le contrôle interne compris

- **0904** Hybridation sur chromosomes métaphasiques **B1000**

Pour deux sondes ou plusieurs sondes

- **0905** Hybridation sur noyaux interphasiques **B500**

Quel que soit le nombre de sondes utilisées

Les cotations des examens 0903, 0904 et 0905 ne sont pas cumulables entre elles.

5.5. Actes de culture cellulaire

- Pour étude du cas index et étude familiale, si nécessaire
4030 Cultures cellulaires par individu testé : **B1250**

- Pour diagnostic prénatal, si nécessaire
4031 Cultures cellulaires (cellules amniotiques et trophoblastiques) : **B1250**

Les cultures cellulaires ne sont justifiées que dans les cas suivants :

- . Diagnostic sur amniocentèse ;
- . Prélèvement de villosités chorales de taille insuffisante ;
- . Prélèvement de villosités chorales pour certaines maladies (ex : dégradation des acides gras, mucopolidoses I, II, III, maladie de Niemann Pick C ...).

5.6. Dépistage des anomalies chromosomiques par ADNlc

- **4087** Dépistage de la trisomie 21 fœtale par analyse de l'ADN libre circulant dans le sang maternel : **B1344**

Dans les indications prévues par l'arrêté en vigueur fixant les bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatals de la trisomie 21.

Il ne pourra être coté qu'un seul acte 4087 par patiente et par grossesse.

- **4088** Second dépistage de la trisomie 21 fœtale par analyse de l'ADN libre circulant dans le sang maternel : **B1344**

En cas de résultat ininterprétable de l'acte 4087, un second dépistage de la trisomie 21 fœtale par l'analyse de l'ADN libre circulant dans le sang maternel peut être effectué sur un nouveau prélèvement.

Il ne pourra être coté qu'un seul acte 4088 par patiente et par grossesse.

5.7. Nomenclature des actes HN

Depuis 2015, le système de financement des actes hors Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM), dite nomenclature RHN (Référentiel des actes Hors Nomenclature) a été modifié. Le nouveau référentiel des actes innovants hors nomenclature (RIHN), mis en place par la direction générale de l'offre de soins (DGOS), prévoit la réalisation d'un recueil prospectif et comparatif de données pour valider l'efficacité et l'utilité clinique et médico-économique de ces actes innovants. Les actes inscrits dans ce référentiel ont vocation à l'issue de 2 ou 3 ans soit à être intégrés à la NABM si leur validation médico-économique est positive, soit à être supprimés dans le cas inverse. Pendant leur inscription au RIHN, **ces actes sont dispensés d'accréditation.**

Cette nomenclature est régulièrement mise à jour, les nouveaux actes peuvent être soumis deux fois par an via un dossier de soumission disponible sur le site de la DGOS. A l'occasion du passage au RIHN, la liste des actes inscrits au RHN a été revue et "nettoyée" des actes obsolètes. Par ailleurs, les actes utilisés en diagnostic mais toujours pas inscrit à la NABM ont été regroupés dans une liste complémentaire devant faire l'objet d'une analyse spécifique par la HAS et la CNAM (l'échéance de cette analyse n'est malheureusement pas fixée au jour de la rédaction de ce texte).

Un même examen ne peut pas être coté à la fois à la NABM et en [RIHN](#).

B. CONDITIONS PRATIQUES DE RÉALISATION DES ACTES DE CYTOGÉNÉTIQUE

1. PERSONNEL

La situation est très variable d'un laboratoire à l'autre, en fonction du type d'activité et de la structure du laboratoire. Le laboratoire doit définir ses besoins en personnel en fonction de son organisation et de son activité pour réaliser ses prestations conformément à l'état de l'art, et en conformité avec ses contrats de prestations.

Les compétences et qualifications des opérateurs doivent répondre aux exigences du § 5.1 de la norme NF EN ISO 15189.

1.1. Biologistes/ Responsables

Le biologiste doit répondre aux exigences des décrets de référence. Il est obligatoire (NF EN ISO 15189, § 4.1.2.5) que l'encadrement de chaque laboratoire, toutes activités confondues, comprenne au moins deux praticiens habilités dans les domaines d'activité du laboratoire pour assurer la continuité des soins, la discussion des dossiers difficiles et la formation continue.

1.2. Personnel technique

Le temps d'exécution d'un examen diffère d'une pathologie à l'autre et d'un patient à l'autre, dépend de la structure du laboratoire et de son équipement en automates. Le nombre moyen d'examens effectué par technicien doit être suffisant pour permettre une qualité et une fiabilité des résultats répondant aux critères définis par les Évaluations Externes de la Qualité (EEQ), le maintien des connaissances au moyen des formations continues ainsi que l'acquisition et la maîtrise des nouvelles techniques. Il est rappelé que la spécialisation de technicien en cytogénétique nécessite une formation et un apprentissage long, en général d'une durée d'un an pour acquérir une compétence spécifique. Il est de la responsabilité des biologistes d'assurer la formation continue du personnel et le maintien des compétences.

1.3. Personnel médico-administratif

Il assure l'accueil et l'enregistrement des échantillons, la diffusion des résultats, l'archivage des dossiers, voire le bilan d'activité du laboratoire et la prise des rendez-vous le cas échéant. Les missions sont définies en fonction de l'organisation du laboratoire.

2. LOCAUX

Les locaux doivent être conformes aux instructions de la norme NF EN ISO 15189 § 5.2 ou du GBEA et pour le diagnostic prénatal aux dispositions de l'article [R2131-6 du Code de la Santé Publique](#).

Les accès aux laboratoires doivent être réglementés. Il est nécessaire de disposer d'une pièce sombre pour l'observation en microscopie fluorescente, d'au moins une pailleuse dédiée aux techniques de FISH. Il est nécessaire d'avoir une salle réservée à la culture cellulaire, idéalement avec système de traitement d'air ou tout autre dispositif (PSM, ...) adapté à la protection des échantillons. Certaines techniques peuvent nécessiter un espace pré-PCR séparé du post-PCR.

Les températures des locaux doivent être maîtrisées pour permettre le bon fonctionnement des incubateurs et des automates le cas échéant, le stockage correct des échantillons et des réactifs, la bonne réalisation du choc hypotonique et de l'étalement chromosomique. La marche en avant pour les techniques d'amplification doit être respectée.

3. INFORMATIQUE

Le système informatique est un élément clé du fonctionnement du laboratoire et doit être pensé comme tel afin d'être adapté aux nécessités du laboratoire et aux spécificités de la cytogénétique.

Il doit permettre entre autres :

- l'enregistrement des dossiers des patients, l'archivage des données et des résultats,
- la délivrance d'un compte-rendu cytogénétique adapté,
- de fournir une aide pour l'élaboration des rapports d'activité réglementaires,
- une connexion entre les différents automates et le système général du laboratoire,
- la confidentialité des données (voir RGPD)

Une attention particulière est nécessaire au choix des logiciels d'analyses et d'interprétation. Ils doivent avoir été testés et validés en interne et être, lorsqu'ils existent, marqués CE-IVD.

4. MATERIEL OBLIGATOIRE SPÉCIFIQUE A LA CYTOGENETIQUE

La liste décrite ci-dessous est commune à l'ensemble des disciplines de cytogénétique. En cytogénétique constitutionnelle, elle permet de répondre, entre autres, à l'arrêté du 27 novembre 2008 qui fixe la liste des équipements des laboratoires d'analyses de biologie médicale nécessaires à la réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales.

Deux exemplaires des équipements indispensables (incubateurs, microscopes etc...) doivent exister afin de pallier à leur défaillance éventuelle. Une stratégie de secours doit exister si l'équipement n'est pas dupliqué.

Il est recommandé au minimum de disposer de :

- deux incubateurs pour culture cellulaire (+/- à CO2 selon le type de culture) équipés si possible d'un dispositif de surveillance continue,
- une hotte à flux laminaire (classe sécurité microbiologique, chaque prélèvement étant susceptible d'être pathogène),
- une hotte chimique pour manipulation des produits toxiques,
- une centrifugeuse basse vitesse,
- une centrifugeuse à micro-tubes,
- deux bains thermostatés,
- deux réfrigérateurs 4°C,
- un congélateur -20°C,
- un dispositif permettant l'hybridation d'acides nucléiques (plaque chauffante...),
- deux photomicroscopes ou microscopes équipés d'un système d'acquisition et de traitement d'image, dont l'un permettant l'analyse en fluorescence,
- un microscope à contraste de phase,
- un microscope inversé,

- un équipement numérique analyseur d'images permettant d'assurer la reproduction et la conservation des documents (les logiciels d'acquisition sont à mettre à jour en fonction de leur évolution),
- en outre, pour certaines applications : une loupe binoculaire.

Ces dispositifs peuvent être inclus dans des automates prévus à cet effet.

L'entretien et la maintenance du matériel et la protection du personnel contre les risques toxiques ou infectieux doivent se conformer au GBEA ou à la norme NF EN ISO 15189 et faire l'objet de procédures écrites et d'un contrôle préventif régulier (élaboration d'un programme de surveillance, traçabilité de la maintenance, existence de procédures dégradées...).

En ce qui concerne les réactifs et le matériel, la réglementation impose le marquage CE/IVD pour les examens de génétique prénatale, lorsque ce marquage existe (voir arrêté du 6 mars 2018).

5. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

5.1. Prélèvements

Les prélèvements doivent être effectués en se conformant à la norme NF EN ISO 15189 ou au GBEA et pour la cytogénétique constitutionnelle à l'arrêté du 27 mai 2013 définissant les règles des bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales pour les prélèvements constitutionnels.

De plus, les échantillons doivent être recueillis stérilement et acheminés dans un délai compatible avec la survie des cellules, à définir et à valider par le laboratoire.

5.2. Identification des prélèvements et informations à fournir

L'étiquetage des tubes et flacons contenant les échantillons doit être effectué dans le respect de la norme NF EN ISO 15189 ou du GBEA et est sous la responsabilité du préleveur.

Les échantillons seront accompagnés d'une fiche de prescription. Outre les obligations décrites dans la norme NF EN ISO 15189, la fiche de prescription précise :

- l'identification du médecin prescripteur et ses coordonnées ; cette information est indispensable pour diffuser le compte rendu en cytogénétique constitutionnelle,
- le contexte clinique : le motif de la demande et le diagnostic suspecté, s'il s'agit d'un suivi, les renseignements cliniques spécifiques susceptibles de déterminer le choix des techniques à mettre en œuvre, les traitements récents éventuels susceptibles d'affecter la qualité de l'examen (radio- ou chimiothérapie, par exemple).

En l'absence de ces informations, le laboratoire exécutant l'analyse doit tout mettre en œuvre pour éviter l'envoi du résultat. Cependant, si ces éléments de contexte ne peuvent pas être obtenus, le compte-rendu du résultat devra le mentionner.

5.3. Transport

Le transport doit répondre à la NF EN ISO 15189, aux conditions ADR (Accord européen relatif au transport international des marchandises Dangereuses par la Route), ou le cas échéant aux conditions IATA (Association international du transport aérien), en particulier en ce qui concerne les règles de triple emballage (tube et double emballage). Les conditions de prélèvements et d'acheminement doivent être définies au préalable par contrat (par ex dans le manuel de prélèvement), en particulier le délai et la température d'acheminement :

- Les échantillons ne doivent pas être congelés (pas de glace pour les cultures cellulaires). Idéalement, la température doit être tracée.
- Le délai d'acheminement choisi doit permettre une réception par le laboratoire dans les délais définis et validés par le laboratoire.

D'après l'arrêté du [27 Mai 2013](#) définissant les règles des bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales pour les prélèvements constitutionnels, "l'organisation de la phase préanalytique et du transport sont de la responsabilité du laboratoire qui réalise les prélèvements. Ce dernier doit être en mesure de transmettre les informations cliniques, familiales et biologiques ainsi que les documents spécifiques associés (attestation d'information, consentements...)".

5.4. Réception des prélèvements

Le laboratoire ayant accepté l'échantillon primaire est responsable de l'examen biologique dans sa globalité.

Il doit indiquer au prescripteur ou au laboratoire préleveur une éventuelle non-conformité de l'échantillon et ses conséquences possibles sur le résultat. En particulier, sa quantité et sa qualité devront être suffisantes pour la réalisation de l'examen. En cas de refus d'un échantillon, celui-ci et son motif doivent être immédiatement portés à la connaissance du prescripteur ou du laboratoire préleveur.

En cas de prélèvement difficile ou nécessairement unique, le laboratoire peut être amené à accepter des échantillons non conformes. Le clinicien prescripteur doit en être informé et les limites de l'interprétation devront être mentionnées sur le compte-rendu de résultats. Les échantillons seront accompagnés de la fiche de prescription (cf § 4.2.)

6. PROCESSUS ANALYTIQUE

6.1. Cytogénétique conventionnelle

6.1.1. Culture

La mise en culture se fera selon les méthodes validées par le laboratoire.

6.1.2. Marquage en bandes

Le laboratoire doit réaliser en routine pour chaque caryotype au moins une technique de marquage des chromosomes en cytogénétique : marquage en bandes RHG, GTG, GTL ou QFQ. La résolution obtenue est évaluée par référence aux exemples de l'annexe 1.

6.2. FISH

Les laboratoires de cytogénétique doivent être équipés et être capables de réaliser et d'interpréter des techniques de FISH avec des sondes commerciales.

L'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) ne peut en aucun cas remplacer une étude complète du caryotype.

Les techniques de cytogénétique moléculaire sont appliquées en fonction des informations cliniques et/ou des données cytogénétiques. La FISH peut être réalisée sur les métaphases ou sur les noyaux interphasiques. Elle peut être réalisée sur différents tissus ou supports (cellules cultivées ou non, coupes tissulaires) en prénatal ou postnatal (lymphocytes, fibroblastes, gamètes, cellules embryonnaires, cellules tumorales).

Notions générales

L'analyse FISH interphasique et métaphasique, avec une seule sonde, ou plusieurs sondes chromosomiques, donne des résultats fiables dans de nombreuses situations cliniques. S'il n'est pas toujours utile de réaliser la FISH, il peut être approprié de vérifier les anomalies apparemment classiques dans le contexte d'une présentation atypique.

Il est nécessaire de bien connaître la sonde utilisée : sa localisation chromosomique, sa structure (séquence répétée, peinture, mono-locus etc...), l'aspect de son signal (couleur, taille) et de le vérifier à chaque hybridation. Les signaux des sondes peuvent varier entre les lames (en fonction de l'âge, de la qualité, des écarts de signaux en métaphase) et au sein d'une lame. Lorsqu'une délétion ou un réarrangement est suspecté, le signal sur le chromosome normal est le meilleur contrôle de l'efficacité de l'hybridation et la sonde de contrôle fournit également un contrôle interne de l'efficacité de la procédure FISH. Il est important d'apprécier la taille relative des signaux d'une même paire chromosomique pouvant refléter une délétion, une duplication ou un point de cassure. En fonction de la sensibilité et de la spécificité de la sonde et du nombre de cellules analysées, la possibilité d'un mosaïcisme doit être envisagée et des commentaires doivent être formulés le cas échéant.

Les résultats de FISH pourront être complétés d'une analyse de type caryotype. Ceci est essentiel en constitutionnel en cas de divergence entre les résultats de laboratoire et l'indication clinique.

Interprétation des résultats : lors de l'interprétation des résultats, les limites ou polymorphismes de la ou des sonde(s) FISH utilisée(s) doivent être clairement connues. Il faut être prudent dans l'interprétation des résultats normaux pour les sondes de séquence répétée, de rares individus ont un petit nombre de séquences répétées cibles. L'interprétation des résultats nécessite la supervision d'un cytogénéticien qualifié.

Le personnel doit avoir une formation appropriée sur les types d'échantillons à analyser.

Les laboratoires devraient établir des normes pour l'analyse et l'interprétation des résultats.

Le technicien ou praticien doit analyser un nombre suffisant de cellules en fonction du type de sonde et en fonction de l'indication.

La FISH Interphasique.

Le signal dans les cellules en interphase peut être variable, il faut donc examiner un grand nombre de cellules. L'analyse FISH en interphase ne peut détecter qu'un sous-ensemble d'anomalies chromosomiques et ne peut pas fournir un résultat complet. Elle peut induire en erreur en l'absence d'analyse cytogénétique en bandes conventionnelles. La FISH interphasique sur des cellules cultivées ou non cultivées peut permettre de mieux évaluer les niveaux de mosaïcisme ou de chimérisme de lignées cellulaires présentant des anomalies préalablement établies par l'analyse chromosomique standard.

6.2.1. Conditions d'application.

En règle générale, la FISH, technique ciblée, est une technique complémentaire d'une technique pangénomique (caryotype ou ACPA), et ne doit être utilisée que comme telle, sauf indications particulières.

6.2.2 types de sondes

Les sondes utilisées pour l'hybridation *in situ* identifient soit des séquences répétées (bras long de l'Y, sondes alphas centromériques spécifiques ou non, sondes télomériques non spécifiques), soit des séquences uniques (sondes de locus ou régionales), ou encore un mélange de séquences uniques s'hybridant sur tout ou partie d'un chromosome (sondes de peinture globale ou partielle).

Certaines sondes sont commercialisées par des industriels, d'autres sont fabriquées par les laboratoires.

Pour les sondes préparées au laboratoire : la sonde sera préparée et se verra attribuer un numéro de lot unique (dont le format est à déterminer par le laboratoire). Le tube devra mentionner au minimum le nom de la sonde, le numéro de lot, et une date de fabrication.

La date de péremption des sondes est définie par le laboratoire en se basant sur son expérience. Pour les laboratoires qui débutent une activité de fabrication de sonde, il est recommandé d'utiliser une durée de péremption courte (un an par exemple) qui sera par la suite augmentée en fonction de l'expérience acquise.

Avant son utilisation en diagnostic, la sonde devra avoir été validée sur le plan technique.

6.2.3. Validation technique des sondes

1/ Pour les sondes communes commercialisées :

La vérification de la sensibilité et de la spécificité est réalisée par contrôle de l'hybridation sur le chromosome homologue et/ou par l'analyse de l'hybridation d'une sonde témoin du chromosome testé sur métaphase.

2/ Pour les sondes à façon non commercialisées ou commercialisées :

Pour chaque nouvelle sonde utilisée au laboratoire, il est recommandé d'hybrider la sonde sur une préparation métaphasique pour :

- s'assurer d'un signal d'hybridation correct permettant une interprétation des signaux d'hybridation obtenus (intensité suffisante pour différencier le signal de la sonde du bruit de fond sans ambiguïté) ;
- vérifier la localisation de la sonde sur des métaphases afin de vérifier une erreur de localisation ou une cross-hybridation ; la spécificité sera déterminée par toute technique permettant d'identifier le chromosome d'intérêt (bandes, co-hybridation avec une autre sonde spécifique permettant d'identifier le chromosome, hybridation sur une lame connue portant une anomalie de ce chromosome) ;
- noter la présence d'une éventuelle co-hybridation ;
- évaluer la reproductibilité d'hybridation de la sonde en comptant au moins 20 métaphases et 100 noyaux pour une utilisation en interphase.

Une sonde donnant un signal d'hybridation correct, hybridant dans 95 % des métaphases et au moins 85 % des noyaux, bien localisée pourra être utilisée en diagnostic.

La présence d'une co-hybridation rend la sonde inutilisable en interphase, mais n'empêchera pas son utilisation sur métaphases moyennant une interprétation plus rigoureuse. Il est ainsi

déconseillé d'utiliser ce type de sonde pour rechercher une duplication ou vérifier un gain mis en évidence en ACPA.

Pour chaque nouveau lot d'une sonde déjà réalisée préalablement et contrôlée dans le laboratoire, un contrôle plus sommaire sur 10 mitoses pourra être réalisé pour vérifier la qualité du signal d'hybridation et la localisation cytogénétique. La preuve de la vérification devra être conservée.

6.2.4. Utilisation des sondes

6.2.4.1. Modalité de lecture

Toutes les étapes techniques doivent être tracées sur un support défini par le laboratoire et comprenant au moins :

- Opérateurs
- Réf et lots des réactifs
- Qualité et intensité du signal
- Nombre de Noyaux et/ou métaphases

Une double lecture des lames au microscope est recommandée en cas de difficulté d'interprétation à définir dans les dispositions du laboratoire.

6.2.4.2. Conditions d'interprétation du signal

Le résultat pourra être rendu si lors de l'analyse FISH, le signal d'hybridation soit sur une cellule non tumorale soit sur le chromosome témoin (non censé être remanié) ou les deux chromosomes (en l'absence du remaniement recherché, par exemple suspicion de microdélétion 22q11.2) est correctement localisé et d'une intensité permettant de différencier le signal de la sonde du bruit de fond sur au moins 10 cellules.

Pour les sondes couplées à une sonde témoin, l'hybridation de cette sonde témoin sur les deux chromosomes entérinera la validité de la sonde utilisée.

L'intensité et la taille relative des signaux d'une même paire chromosomique sera bien évaluée afin d'identifier une duplication, une délétion, un point de cassure ou un réarrangement. Il peut y avoir coexistence d'une duplication et d'une délétion (22q11.2) rendant l'interprétation caduque.

6.2.5. Robustesse des sondes

L'ADN est une molécule stable. Généralement le marquage de l'ADN fait appel à des liaisons covalentes également stables dans le temps. De ce fait, les sondes FISH sont des réactifs stables dans le temps (*M Doco-Fenzy et al. : FISH probes expiration date in constitutional cytogenetic laboratories, European Human Genetics Conference, 2013, Paris – France*) donc leur utilisation peut se faire en utilisant les mêmes critères de qualité que les sondes n'ayant pas dépassées la date de validité d'utilisation.

Une sonde commerciale ou fabriquée dans le laboratoire, conservée selon les recommandations du fournisseur, pourra être utilisée en diagnostic même après la date de péremption dans des conditions définies par le laboratoire.

Pour l'interphase, il est possible de passer une lame témoin en parallèle pour juger de la qualité du signal d'hybridation obtenu avec toutes les sondes présentes dans le mix réactionnel. Il en est de même si l'hybridation doit être réalisée sur un échantillon précieux et que la sonde n'a pas été testée récemment.

6.2.6. Règles d'utilisation des techniques de cytogénétique moléculaire

Les techniques et interprétation de la FISH dépendent du domaine d'application et du type de sondes utilisées. En fonction des indications des sondes de type différent peuvent être couplées dans une même hybridation.

Les peintures chromosomiques

Elles peuvent être utilisées en cas d'anomalie de structure de grande taille pour rechercher le nombre de partenaires impliqués dans le remaniement et estimer les points de cassures. L'utilisation de sondes loci spécifiques complémentaires peut s'avérer nécessaire à l'interprétation.

L'examen d'un petit nombre de métaphases (idéalement au moins cinq) est généralement suffisant dans ce cas pour apporter l'information recherchée.

Les peintures disponibles dans le commerce sont généralement fiables. Il convient d'interpréter avec soin les positions des points de cassure à partir des résultats de FISH, en parallèle avec les études de banding. Il est à noter que la résolution de la peinture chromosomique peut varier d'une peinture à l'autre. De petits réarrangements peuvent ne pas être détectés, car les peintures chromosomiques peuvent ne pas être uniformément dispersées sur toute la longueur du chromosome cible.

Les sondes " séquence unique "

Pour la détection de sondes à cible unique, les sondes commercialisées sont largement utilisées dans les laboratoires de diagnostic. Le nombre de cellules analysées doit correspondre à la sensibilité et à la spécificité de la sonde sur la lame.

Elles permettent d'étudier un locus spécifique, et sont utilisées en fonction soit d'indications cliniques soit d'indications cytogénétiques.

Le nombre minimum de cellules à analyser (métaphases et/ou noyaux) sera précisé dans les chapitres spécifiques. La recherche de microduplication nécessite une analyse sur mitose et sur noyaux.

En cas d'ACPA positif et d'absence de microduplication en FISH, l'analyse devra être complétée par une technique quantitative ou semi-quantitative, en particulier dans le cadre d'une enquête familiale.

FISH interphasique sans culture cellulaire

Elle est utilisée pour la mise en évidence d'aneuploïdies, homogènes ou en mosaïque, ou d'anomalies de structure, à l'aide de sondes centromériques ou régionales. La co-hybridation d'une sonde témoin dans les mêmes conditions opératoires peut être utile. Le nombre des noyaux à examiner dépend de l'indication et de la sonde utilisée.

L'examen de 50 (minimum) à 100 noyaux si possible, le nombre total doit être adapté à l'indication.

Le nombre concernant les tumeurs solides, Sperm FISH, DPI-FISH, sont précisées dans les chapitres correspondants.

6.3. ACPA

Voir Guide de Bonnes Pratiques spécifique

6.4. ADNlc

Voir Guide de Bonnes Pratiques spécifique

6.5. Génétique moléculaire appliquée à la cytogénétique

L'évolution très rapide des connaissances et des techniques impose, dans chaque laboratoire, une réflexion et un effort de mise en place et de validation de nouvelles méthodes de détection de variation de nombre de copie (qPCR, QMPSF, MLPA, MPLC, MAQ.). Ces nouvelles techniques de biologie moléculaire peuvent notamment être utilisées dans la cadre de la vérification et/ou de la caractérisation d'un remaniement chromosomique chez le proposant et ses apparentés en particulier lorsqu'il s'agit d'un remaniement de petite taille. Cependant la FISH doit rester la technique de référence car elle renseigne sur la mécanique chromosomique à l'origine du CNV.

En constitutionnel, la réalisation des techniques de génétique moléculaire appliquée à la cytogénétique doit être réalisée par des praticiens titulaires des agréments de "biologie moléculaire" et/ou agréments de "génétique moléculaire en vue d'une utilisation limitée aux analyses de biologie moléculaire appliquée à la cytogénétique".

7. RÉSULTATS

7.1. Informations requises sur le compte-rendu

Le rapport de résultat(s) ou compte-rendu (CR) des résultats doit préciser d'après la norme NF EN ISO 15189 et/ou l'arrêté du [27 Mai 2013](#) définissant les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales :

- l'identification du laboratoire ayant édité le compte-rendu,
- l'identification du patient, idéalement en utilisant le nom de naissance selon l'instruction [DGOS.MSIOS N° 2013-281 du 7 juin 2013](#) "relative à l'utilisation du nom de famille (ou nom de naissance) pour l'identification des patients dans les systèmes d'information des structures de soins",
- l'identification du prescripteur,
- l'identification de l'examen,
- les informations relatives au prélèvement : nature, date du prélèvement, date de réception,
- en prénatal, l'âge gestationnel au moment du prélèvement ([Arrêté du 25 Janvier 2018](#) fixant les recommandations de bonnes pratiques relatives aux modalités de prescription, de réalisation et de communication des résultats des examens de biologie médicale concourant au diagnostic biologique prénatal),
- l'indication de l'examen (obligatoire en cytogénétique constitutionnelle de par l'arrêté du [27 Mai 2013](#) définissant les règles des bonnes pratiques applicables à l'examen des

caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales et recommandé en cytogénétique acquise),

- si nécessaire les limites de chacune des techniques utilisées,
- la date de réponse (validation et/ou diffusion) du CR. Si la date de validation n'était pas mentionnée sur le compte rendu, elle doit pouvoir être accessible facilement en cas de besoin,
- lorsqu'un résultat nécessite l'expertise d'un autre laboratoire ou une autre technique, il sera mentionné sur le résultat remis au prescripteur que d'autres examens sont en cours,
- l'identification et la signature du biologiste ayant validé l'examen.

7.2. La formulation des résultats

Le résultat de l'examen sera constitué de 3 parties :

- **La formule chromosomique** rédigée selon la nomenclature ISCN en vigueur
- **La description du ou des anomalies identifiées** : Il est souhaitable de ne pas signaler les variants hétérochromatiques en dehors de cas très particulier et dans ce cas son caractère non pathologique doit être clairement indiqué.
- **L'interprétation des résultats** compréhensible pour les non-spécialistes : préciser le lien de causalité avec le motif initial de prescription de l'examen.
Les éventuels examens complémentaires en cours pour la même indication seront à préciser.
L'absence de renseignements cliniques ou cytogénétiques (type/points de cassure d'un remaniement chromosomique en cas d'enquête familiale) lors de l'interprétation de l'examen figurera dans le commentaire.
- **Si une technique d'hybridation in situ fluorescente** a été réalisée avant l'analyse chromosomique le résultat de cette technique devra mentionner qu'il s'agit d'une analyse partielle ne renseignant que sur les loci des sondes utilisées. Si une technique d'hybridation in situ fluorescente a été réalisée en complément de l'étude cytogénétique conventionnelle, la conclusion de l'étude sera incluse dans le résultat cytogénétique ou éventuellement pourra faire l'objet d'un résultat complémentaire

Si différents tissus ou types cellulaires ont été examinés, l'ensemble de ces informations devront être données pour chacun (formule chromosomique, nombre de cellules examinées, nombre de caryotypes, ...), éventuellement sur le même compte rendu.

7.3. En l'absence d'anomalie observée

La formule " Il n'a pas été décelé d'anomalie dans les conditions de l'examen " est préférable au terme de " caryotype normal ".

La décision d'indiquer ou non le sexe dans le compte-rendu est laissé à l'appréciation du laboratoire. En cas de décision positive, la mention " caryotype masculin ou féminin " est préférable à la mention " sexe masculin ou féminin ".

En cas de discordance entre la formule gonosomique et le sexe phénotypique (femme XY ou homme XX), il est préférable d'éviter dans le commentaire l'utilisation des termes masculin et féminin.

7.4 Résultat FISH

La rédaction de la formule chromosomique de la FISH interphasique et métaphasique respecte la nomenclature de l'ISCN en vigueur. Elle peut compléter la formule du caryotype. Elle est adaptée au type de KIT ou sonde utilisé. Les résultats des sondes des 2 gonosomes si testées sont commentées même si négatives dans les cas suivants : ambiguïté sexuelle, discordance entre le sexe chromosomique et phénotypique, présence du chromosome Y, monosomie X.

Le résultat doit être complété d'une explication en clair des observations et du lien potentiel (si cela est possible) avec l'indication clinique.

Phrases types : exemples

- **Limites de l'examen :**

- FISH interphasique

« L'analyse FISH en interphase ne peut détecter qu'un sous-ensemble d'anomalies chromosomiques et sur un nombre limité de noyaux. Elle ne fournit pas un résultat complet ou et doit être complétée par une analyse cytogénétique en bandes conventionnelles »

- FISH Métaphasique

« La technique de FISH révèle des remaniements chromosomiques uniquement en lien avec les sondes utilisées. Il s'agit d'une analyse partielle des chromosomes qui ne remplace pas le caryotype. »

- **Résultat**

- FISH interphasique

Conclusion résultat normal, masculin KIT 1

« Observation sur l'ensemble des --- noyaux analysés de 2 signaux pour les chromosomes 13, 18 et 21 avec les sondes testées. Observation sur les --- autres noyaux analysés d'un seul signal pour le chromosome X et d'un seul signal pour le chromosome Y avec les sondes testées. Ce résultat n'est pas évocateur d'une aneuploïdie. Ce résultat doit être rendu accompagné d'un conseil génétique. »

Conclusion résultat normal, masculin KIT 2

« Observation en FISH d'un signal pour le chromosome X et d'un signal pour le chromosome Y dans --- noyaux avec les sondes testées. Observation dans --- noyaux de 2 signaux pour les chromosomes 13, 18 et 21. Absence d'aneuploïdie identifiée. Résultat compatible avec un fœtus masculin. La culture cellulaire est en cours. Ce résultat doit être rendu accompagné d'un conseil génétique. »

- FISH Métaphasique

« Observation sur l'ensemble des métaphases analysées de la présence d'un signal sur les chromosomes ---.

Il s'agit donc d'une délétion, duplication, translocation ou bien cela confirme le résultat de ...

Ce résultat est compatible avec l'indication clinique et doit être rendu accompagné d'un conseil génétique. »

8. DÉLAI DE RÉPONSE ET ÉCHECS

Le délai de réponse et le pourcentage d'échecs doivent faire l'objet d'une procédure de contrôle de qualité interne ou d'une évaluation régulière (indicateurs qualités), et dépendent du domaine de cytogénétique considéré.

9. CONSERVATION DE DONNÉES : SAUVEGARDE ET ARCHIVAGE

Définitions :

- **Sauvegarde** : la sauvegarde vise la récupération des données en cas d'évènement rendant celles-ci inaccessibles (perte ou endommagement). La sauvegarde s'applique aussi bien aux données actives qu'aux données inactives (figées). La durée de vie d'une sauvegarde est de moins d'un an.
- **Archivage** : préservation des données anciennes ou dormantes sur une longue durée (supérieure à 1 an).

Le laboratoire doit se mettre en conformité avec le RGPD (Règlement Général sur la Protection des Données) pour la protection des données personnelles des archives et sauvegardes : L'archivage et les sauvegardes des résultats doivent être effectués dans les conditions de sécurité et de confidentialité.

9.1. Documents administratifs et comptes rendus de résultats

- **En constitutionnel :**

Le consentement écrit et les doubles de la prescription de l'examen des caractéristiques génétiques et des comptes rendus d'examens de biologie médicale commentés et signés sont conservés par le médecin prescripteur dans le dossier médical de la personne concernée pendant une durée de trente ans, dans le respect du secret professionnel.

- **En prénatal :**

Les comptes rendus d'examens de biologie médicale et leur commentaire explicatif sont conservés par les laboratoires de biologie médicale pendant une durée de trente ans. Le laboratoire de biologie médicale dans lequel exerce le praticien ayant effectué les examens conserve les copies de l'attestation d'information et du consentement ainsi que l'original de la prescription dans les mêmes conditions que le compte-rendu de l'examen (arrêté du 25 janvier 2018 fixant les recommandations de bonnes pratiques relatives aux modalités de prescription, de réalisation et de communication des résultats des examens de biologie médicale concourant au diagnostic biologique prénatal).

Concernant le dépistage de la trisomie 21 par analyse de l'ADNlc, l'arrêté du 14 Décembre 2018 "fixant les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatals avec utilisation des marqueurs sériques maternels de trisomie 21" prévoit une conservation pendant 5 ans par le laboratoire de l'attestation d'information, du consentement de la femme enceinte, de la prescription et du résultat de l'examen ADNlcT21.

- **En cytogénétique acquise :**

Il n'existe pas de texte réglementaire spécifique. La durée de conservation des feuilles de prescription et des comptes rendus d'examen est définie par le système de management de la qualité du laboratoire conformément à la norme NF EN ISO 15189 (minimum 24 mois selon le référentiel SH REF 02 version 06).

9.2. Documents techniques et matériels biologiques

9.2.1. Images

Il n'existe pas de contraintes réglementaires. Il est proposé de conserver 3 caryogrammes, 2 à 5 métaphases ou noyaux par sonde utilisée en FISH et au moins 1 exemplaire de toute image complémentaire ayant contribué au diagnostic, sous n'importe quel support permettant une réanalyse pendant 10 ans.

9.2.2. Lames

Conservation des lames ayant servi au diagnostic :

- 1 an en prénatal,
- jusqu'au rendu du résultat en postnatal,
- durée laissée à l'appréciation du cytogénéticien responsable pour l'activité de cytogénétique constitutionnelle post-natal, hématologique et FISH (ces dernières seront exploitables le temps de l'émission du signal (<6 mois). Certaines lames de prélèvements précieux peuvent être re-marquées ou réhybridées).

9.2.3. Données bio-informatiques

Pour le dépistage par analyse de l'ADNlc, voir guide de bonnes pratiques spécifiques.
En l'absence à ce jour de contraintes réglementaires ou de recommandations officielles émanant des Sociétés Savantes ou de l'Agence de la Biomédecine, une durée de conservation minimale de 1 an pour les données pangénomiques en postnatal devrait être assurée par les laboratoires réalisant ces actes, à adapter en fonction de l'évolution des textes. En oncohématologie, ceci est laissé à l'appréciation du biologiste mais ce sont des données utiles en cas de rechute ou de récurrence.

9.2.4. Matériel Biologique

Tous matériels permettant une analyse complémentaire et inutilisés à l'issue de l'examen : par exemple culot cellulaire, lames blanches, ADN etc ...

Les durées de conservation **minimales** recommandées sont de

- 1 an en prénatal à compter de la date du prélèvement
- 1 an en postnatal pour un enfant (moins de 15 ans et 3 mois : définition légale) et pour tous les déficits intellectuels et syndrome malformatifs.
- 1 an après la date du prélèvement selon les conditions prévues par les fabricants pour les échantillons biologiques utilisés pour le dépistage ADNlcT21

Dans les autres situations cliniques, la conservation de matériel n'est pas indispensable et sa mise en place laissée à l'appréciation du laboratoire.

En cytogénétique hématologique, la durée de conservation des culots est laissée à l'appréciation du cytogénéticien responsable.

10. EVALUATION DE LA QUALITÉ

10.1. Indicateurs de qualité

Le laboratoire doit mettre en place des indicateurs de suivi de la qualité globale de l'activité. Il est recommandé en cytogénétique constitutionnelle *a minima* de suivre les éléments suivants :

- le pourcentage de dossiers répondus avec un niveau de résolution insuffisant,
- le pourcentage d'échec,
- le pourcentage de dossiers répondus hors délai.

En cytogénétique hématologique, le GFCH a défini des entités / groupes pathologiques et recommande le suivi des indicateurs suivants :

- le pourcentage d'anomalies,
- le pourcentage d'échecs,
- le délai médian de réponse des résultats et à partir de 2020, le nombre de caryotypes exploités répondus dans les délais recommandés

En FISH, l'indicateur retenu est le pourcentage de lames hybridées sur prescription et non rendues.

10.2. Evaluation externe de la qualité

Selon l'article L.6221-9 du code de la santé publique et l'ordonnance No 2010-49 du 13 janvier 2010 ratifiée par la loi N° 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale, les laboratoires doivent participer à une Évaluation Externe de la Qualité (EEQ) au moins une fois par an et assurent l'application de mesures correctives en cas d'EEQ non conforme. Une liste non exhaustive des EEQ disponibles en cytogénétique est fournie en Annexe 7.

II. CYTOGÉNÉTIQUE CONSTITUTIONNELLE POST-NATALE

1. AUTORISATION ET AGRÉMENT

1.1. Autorisation de la structure

Une autorisation de la structure est délivrée par l'ARS. Lorsque le laboratoire dépend d'un établissement de santé, l'autorisation est délivrée à cet établissement.

1.2. Agrément du biologiste

Un agrément délivré par l'agence de la biomédecine (ABM) est nécessaire pour les biologistes en cytogénétique postnatal.

L'agrément est accordé selon les conditions définies par l'ABM :

<https://www.agence-biomedecine.fr/agrement-praticiens-genetique>

Critères d'agrément des biologistes par l'ABM pour les Analyses de cytogénétique, y compris les analyses de cytogénétique moléculaire

Statut : Médecin ou Pharmacien ou Personnalité scientifique avec activité de plus de 2 ans dans un laboratoire de biologie médicale avant 2010.

Diplômes de spécialité ou complémentaires : Toute formation spécifique dans le domaine susvisé, notamment Diplôme de spécialité (DES de biologie médicale, option biologie spécialisée, spécialité génétique ou DES de génétique médicale avec 2 semestres en cytogénétique), Diplôme complémentaire en l'absence du DES de biologie médicale - option spécialité génétique, ou du DES de génétique médicale (DESC de cytogénétique) ou tout diplôme garantissant une formation équivalente en cytogénétique

Expérience : 12 mois dans un ou des laboratoire(s) autorisé(s) pour l'activité demandée avec une attestation de compétence circonstanciée du responsable agréé.

Dans les autres cas, une commission d'agrément est réunie pour statuer.

Le décret n° 2008-321 du 04 Avril 2008 (Postnatal, Caractéristiques Génétiques des Personnes) prévoient que l'agrément des praticiens

- est délivré pour une durée de 5 ans et
- permet d'exercer dans n'importe quelle structure autorisée.

La décision est notifiée au praticien dans un délai de 2 mois à compter de la réception d'un dossier de demande complet (**une Non réponse vaut refus**).

La demande d'agrément est formulée selon un dossier type défini par le directeur général de l'Agence de Biomédecine (disponible sur le site de l'Agence).

1.3. Déclaration des cytogénéticiens

Il appartient à l'établissement ou au laboratoire d'informer l'Agence Régionale de la Santé compétente et l'Agence de la biomédecine :

- du nom des praticiens exerçant dans son établissement ou laboratoire préalablement à la mise en œuvre de l'autorisation,
- du nom de tout nouveau praticien agréé intégrant la structure,

- du départ à la retraite de ces praticiens.

2. INFORMATION ET CONSENTEMENT DES PATIENTS

Décret n° 2003-462 du 21 mai 2003 Article R. 1131-5: "Le médecin consulté délivre une attestation certifiant qu'il a apporté à la personne concernée les informations définies ci-dessus et qu'il en a recueilli le consentement dans les conditions prévues à l'article R. 1131-4. Cette attestation est remise au praticien agréé réalisant l'examen ; le double de celle-ci est versé au dossier médical de la personne concernée"

Cependant, les modalités d'information préalable des patients et de leurs parents doivent se conformer aux décrets d'application en cours (arrêté) stipulant que :

Les laboratoires de biologie médicale réalisant des examens de génétique ont des contraintes propres à cette spécialité, en particulier celles de s'assurer de la présence de l'attestation d'information donnée à la personne et du consentement écrit de celle-ci ;

Le consentement de la personne et l'attestation de consultation du prescripteur sont obligatoires.

3. ECHANTILLONS

3.1. Prélèvement

Sang : 1 à 3 ml de sang seront prélevés stérilement sur héparine de sodium ou de lithium faiblement dosée (10 à 20 U/mL de sang).

Peau ou autre tissu : Il est souhaitable que le fragment biopsié ait un volume minimum de 2 mm³ et soit mis si possible extemporanément dans du milieu de transport préalablement défini et validé par le laboratoire (par exemple milieu de culture).

Frottis buccal : Il est souhaitable de réaliser le frottis extemporané après rinçage de la bouche, sur au minimum 2 lames.

3.2. Identification et indications

Le prélèvement doit être accompagné, outre les renseignements habituels (voir partie commune), d'une feuille de prescription (voir 5.4.3 de la norme), d'un courrier avec si possible les antécédents familiaux et un arbre généalogique.

Il est souhaitable que les syndromes dysmorphiques et malformatifs soient évalués par un médecin ayant une connaissance spécifique des maladies chromosomiques, au cours d'une consultation ou, à défaut, à partir de photographies.

En cas d'étude familiale, le caryotype des apparentés doit être étudié autant que possible dans le même laboratoire sauf contraintes géographiques évidentes. Dans le cas contraire, le laboratoire ayant réalisé l'examen initial doit transmettre au laboratoire qui lui en fait la demande le compte-rendu et si possible les images du cas index (l'arrêté du 27 mai 2013 définissant les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales prévoit que : "Lorsque les examens des différentes personnes d'une même famille ne sont pas réalisés dans le même laboratoire, celui qui a réalisé l'examen du cas index doit fournir sur demande le résultat aux laboratoires

qui ont en charge les examens des apparentés... Si nécessaire, les laboratoires peuvent se transmettre les échantillons de prélèvement entre eux”).

4. EXAMEN CYTOGÉNÉTIQUE

4.1. Culture

La mise en culture se fera selon les procédures écrites et disponibles au laboratoire. L'ensemencement doit se faire échantillon par échantillon.

4.2. Marquage en bandes

Le laboratoire de cytogénétique doit maîtriser deux techniques de marquage complémentaires: RHG et GTG ou GTL ou QFQ, ainsi que les marquages en bandes QFQ (ou DA-DAPI), CBG, coloration NORs ou équivalent (FISH).

Pour chaque caryotype, le marquage en bandes (RHG ou/et GTG ou GTL ou QFQ) est obligatoire et doit être réalisé avec niveau de résolution adapté aux indications (cf annexe 6). La mise en évidence de certaines anomalies de structure est facilitée par l'examen des deux types de marquage RHG et GTG/QFQ/GTL. Si cela est nécessaire à l'interprétation, les techniques complémentaires de cytogénétique (bandes CBG, NOR...) ainsi que les techniques de cytogénétique moléculaire seront mentionnées sur le rapport de résultat(s). Elles peuvent être réalisées dans un deuxième temps.

4.3. Nombre de cellules examinées

Le nombre de cellules à examiner doit faire l'objet d'une procédure écrite.

15 cellules doivent être analysées au minimum, et au moins 3 caryogrammes établis.

L'analyse d'une métaphase comprend au minimum le décompte du nombre de chromosomes et l'identification des gonosomes.

La recherche d'une anomalie des gonosomes sera décrite dans le paragraphe suivant.

En cas de recherche ciblée d'une mosaïque en rapport avec un phénotype particulier (par exemple suspicion de syndrome de Turner), au moins 50 cellules seront étudiées en cytogénétique conventionnelle et/ou en FISH. Éventuellement, un nouveau prélèvement sera réalisé ou un autre tissu examiné. Le comptage de 50 cellules permet d'éliminer à 99% une mosaïque de 10% (voir annexe 3).

4.4. Recommandations en cas remaniement de structure non récurrent

Il est recommandé en cas d'anomalie *de novo* de confirmer le nombre et les partenaires impliqués par des peintures chromosomiques éventuellement associées à des sondes loci-spécifiques.

Dans le cadre d'une anomalie familiale, le nombre et les partenaires impliqués doivent avoir été vérifiés sur un porteur de l'anomalie familiale à l'état équilibré.

En présence de signes cliniques et d'une anomalie de structure apparemment équilibrée au caryotype, une ACPA est recommandée afin de rechercher un déséquilibre génomique aux points de cassure ou ailleurs dans le génome.

Une ACPA peut également être réalisée pour préciser la taille d'un déséquilibre identifié au caryotype.

5. CAS PARTICULIERS

5.1. Découverte d'une mosaïque

Le résultat ne peut être rendu qu'après examen d'un nombre suffisant de cellules (annexe 3). La réponse doit reprendre le nombre exact de cellules observées et associer un commentaire explicitant chacune des lignées observées.

Ex : mos 45,X [15]/46,XX[5]

Caryotype féminin montrant sur les 20 métaphases analysées 15 cellules avec monosomie X (75% des cellules étudiées)

L'observation d'une ou deux cellules anormales pose la question d'un accident *in vitro* ou d'un clone pathologique. D'après la nomenclature ISCN, un clone se définit par la présence d'au moins 2 cellules comportant le même chromosome surnuméraire ou la même anomalie de structure, ou de 3 cellules ayant perdu le même chromosome. En pratique ces critères doivent être interprétés en fonction de l'indication clinique, du nombre de cellules examinées, de la nature de l'anomalie, de la situation sur la lame des cellules anormales et de la durée de la culture (important pour les fibroblastes). En cas de doute sur la réalité biologique de la mosaïque, un deuxième prélèvement est recommandé pour éliminer un accident *in vitro*.

Dans la mesure du possible au moins 50 cellules doivent être analysées (pourcentage de mosaïque exclu de 5% avec un degré de confiance de 0,99).

L'étude du caryotype conventionnel peut-être complété par la FISH.

Conduite à tenir en cas de :

- **Perte ou gain d'un gonosome**

La perte ou le gain d'un chromosome sexuel dans quelques cellules est un phénomène physiologique qui est fonction de l'âge et n'a pas de signification particulière en l'absence de signes cliniques évoquant le syndrome de Turner ou une insuffisance ovarienne, et en l'absence d'ambiguïté sexuelle ou d'anomalie du spermogramme (Russell LM, Strike P, Browne CE, Jacobs PA. X chromosome loss and ageing. *Cytogenet Genome Res* 2007;116(3):181-5).

En dehors d'une indication évocatrice, une mosaïque avec moins de 5% de cellules variantes et posant des difficultés d'interprétation, ne devra pas être mentionnée sur la feuille de résultat. Une attention particulière à la structure de l'Y devra cependant être apportée en cas de découverte d'une ou deux cellules 45,X chez un homme.

Dans le cas d'une monosomie X apparemment homogène, la recherche d'un second clone est nécessaire (50 cellules analysées en cytogénétique conventionnelle ou par FISH avec les sondes centromériques des chromosomes X et Y). En cas de d'identification d'un clone avec un marqueur de l'Y, la recherche de SRY est préconisée (risque de gonadoblastome). En absence de découverte d'un second clone en cytogénétique conventionnelle ou moléculaire, il pourra être discuté la recherche de SRY par PCR.

De la même façon, en cas de mosaïque avec un clone 45,X et un clone contenant de l'Y, la présence de SRY doit être recherchée surtout en cas d'aspect évocateur d'un chromosome Y remanié.

- **Perte d'un autosome**

En l'absence de signes cliniques, la perte d'un autosome dans quelques cellules peut être considérée comme survenue *in vitro* et ne nécessite généralement pas de comptage supplémentaire.

- **Gain d'un autosome**

Suivant les indications, une attention particulière sera portée aux chromosomes 8, 9, 13, 18, 22 et surtout 21 qui correspondent aux trisomies viables les plus fréquentes.

5.2. Chromosomes surnuméraires

Exclure les marqueurs les plus fréquents (marqueur dérivé d'acrocentrique, i(18)(p10), i(9)(p10) et i(12)(p10)) et prévoir une ACPA pour les autres. L'identification centromériques des autres marqueurs en cas d'ACPA sans CNV cliniquement significatif est laissé à l'appréciation des laboratoires selon le contexte clinique (indication, caractère hérité ou *de novo*, ...).

5.3. Les transfusions sanguines et greffes de cellules souches hématopoïétiques

En cas de transfusion d'un ou deux culots de globules blancs, un délai d'une semaine est nécessaire avant de réaliser un caryotype en l'absence de déficit immunitaire. Ce délai peut être ramené à 2 ou 3j en cas de transfusion de culot globulaire ou plaquettaire qui contiennent très peu de blancs.

En cas de déficit immunitaire associé, ou en cas de transfusion massive, un délai d'au moins 6 semaines est nécessaire avant de réaliser un caryotype constitutionnel.

5.4. Patient avec déficit immunitaire et/ou lymphopénie

Ces situations conduisent souvent à un échec de culture. Pour limiter ces échecs, il est possible de compléter les cultures avec de l'IL2 (20U/ml de milieu) en plus des stimulants lymphocytaires habituels.

5.5. Les variants hétérochromatiques

Les variants classiques qui portent sur les variations de taille et de position de l'hétérochromatine du 1, du 9 et du 16, des bras courts des acrocentriques et du bras long de l'Y ne nécessitent pas d'étude familiale. Il n'est pas utile de les reporter sur le compte-rendu, mais s'ils le sont, le caractère non pathogène doit être inscrit clairement dans le commentaire.

Pour les variants inhabituels, les techniques de caractérisation de l'hétérochromatine doivent être appliquées et seront alors mentionnées sur le rapport de résultat avec l'interprétation nécessaire. L'étude du caryotype des parents pourra si besoin affirmer le caractère transmis du variant.

5.6. Les variants euchromatiques

Afin de définir un chromosome anormal comme un variant, différentes stratégies peuvent être utilisées : double marquage RHG et GTC, marquage en CTG pour exclure de l'hétérochromatine, bibliographie, étude parentale ...

L'existence d'un variant euchromatique est à noter sur le compte-rendu. Le caractère bénin doit être clairement notifié dans la conclusion.

5.7. Les sites fragiles

Il faut distinguer les sites fragiles communs qui surviennent en culture et les sites fragiles rares qui sont transmis de façon dominante. Les sites fragiles rares autosomiques sont généralement considérés comme des variants sans signification pathologique et peuvent alors ne pas être mentionnés sur le compte rendu.

5.8. Les syndromes d'instabilité chromosomique et les maladies cassantes

Se référer au guide de bonnes pratiques spécifique.

Voir le document dans la section maladies cassantes du site de l'ACLF contenant également la liste des laboratoires acceptant des prélèvements extérieurs : <http://www.eaclf.org/bulletin.php>

5.9. Les fibroblastes

Tout laboratoire de cytogénétique constitutionnelle doit avoir l'équipement et la compétence pour la culture de fibroblastes cutanés. En cas d'impossibilité matérielle, il est indispensable d'avoir un sous-traitant capable d'effectuer cette culture. On rappelle que certaines anomalies chromosomiques sont préférentiellement dépistées sur des cultures de fibroblastes. (ex : i(12)(p10)).

6. HYBRIDATION IN SITU

- **Au moins 10 mitoses et si possible 20 (si mosaïcisme connu) doivent être analysés**
- **En cas de recherche de duplication, compléter l'étude par l'analyse d'au moins 25 noyaux**

Elle peut être complémentaire à l'analyse cytogénétique en cas de recherche d'anomalies des chromosomes sexuels.

L'examen de 50 (minimum) à 100 noyaux si possible, le nombre total doit être adapté à l'indication.

7. ACPA

L'ACPA remplace aujourd'hui le caryotype haute résolution et les techniques ciblant les déséquilibres sub-télomériques (ex MLPA) qui ne doivent plus être utilisées dans le cadre de l'exploration des déficiences intellectuelles². Son utilisation doit se conformer au Guide de Bonnes Pratiques de l'Analyse Chromosomique sur Puces à ADN.

8. TECHNIQUES DE GENETIQUE MOLECULAIRE APPLIQUEE A LA CYTOGÉNÉTIQUE

Les techniques telles que qPCR, MLPA, QMPS, ADNIc etc ... peuvent s'avérer nécessaires. Dans ce cas, l'agrément de Génétique Moléculaire est nécessaire, soit l'agrément "non limité", soit l'agrément limité aux "analyses de Biologie Moléculaire appliquées à la cytogénétique".

9. RÉSULTATS

Pour l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales, le rapport de résultat et les modalités de rendu au prescripteur doivent se conformer à l'arrêté du 27 mai 2013 définissant les règles de bonnes pratiques. L'information de la parentèle et des apparentés en cas d'anomalie génétique grave est réalisée selon les instructions du décret N° 2013-527 du 20 juin 2013 relatif aux conditions de mise en œuvre de l'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques à finalité médicale. Le patient doit être informé en amont de la réalisation de l'examen qu'en fonction du résultat de l'analyse il peut être amené à obligatoirement informer sa parentèle (directement ou via le médecin prescripteur) sous peine d'engager sa responsabilité sur un plan juridique.

Lors d'une suspicion de trisomie 21 ou un DSD (Disorder of Sexual Development) à la naissance, un premier résultat par FISH ou PCR doit être rendu sous 48h ouvrées.

En dehors de ces cas particuliers, le délai de réponse habituel du laboratoire ne doit pas dépasser 21 jours. Ce délai peut être plus important en cas d'anomalie chromosomique complexe et/ou difficile à caractériser ou de nécessité de réaliser les caryotypes parentaux et/ou une enquête familiale.

Le compte-rendu contiendra les informations suivantes :

- le(s) type(s) de marquage en bandes utilisé(s),
- le nombre total de métaphases examinées,
- le nombre de caryogrammes établis,
- la résolution globale obtenue.

Si la qualité de l'examen est en dessous des standards fixés (cf annexe 6), cela doit être signalé et les limites du résultat expliquées.

La résolution globale correspond à la résolution obtenue pour les deux meilleurs caryotypes [voir annexe 1]

En cas d'anomalie, celle-ci sera décrite : type de remaniement, aspect apparemment équilibré ou déséquilibré pour les remaniements de la structure chromosomique, caractère homogène ou en mosaïque, chromosomes et bras chromosomiques impliqués.

Un commentaire sur les conséquences médicales du résultat signalera

- les conséquences phénotypiques des anomalies observées sans obligatoirement décrire de façon détaillée le phénotype (ex citer le nom du syndrome). Les conséquences phénotypiques pourront être détaillées dans un courrier joint au résultat,
- la nécessité éventuelle d'examens complémentaires (en génétique moléculaire, par exemple),
- la nécessité éventuelle d'une étude familiale ou d'une consultation de génétique chromosomique.

(cf. arbres décisionnels)

Le résultat ne doit être communiqué au patient que par le prescripteur (décret 2008-321 et Arrêté du 27 mai 2013).

Dans le cas où le prélèvement est transmis par un laboratoire client, la loi de Biologie et l'Arrêté du 27 Mai 2013 imposent au laboratoire réalisant l'examen de transmettre le résultat au laboratoire préleveur qui est chargé de le communiquer au prescripteur. Les modalités d'échange d'information entre les deux laboratoires doivent être formalisées dans un contrat de prestation (cf § 4.4 de la norme NF EN ISO 15189).

On pourra cependant, à volonté du laboratoire, rappeler au biologiste destinataire par une mention sur le résultat qu'il ne doit en aucun cas le transmettre directement au patient.

Pour la FISH Voir plus haut « résultat et compte rendu »

III. CYTOGÉNÉTIQUE CONSTITUTIONNELLE PRÉNATALE

1. AUTORISATION ET AGREMENT

Pour la réalisation des examens de cytogénétique constitutionnelle prénatale, une autorisation de la structure est délivrée par l'ARS. Cette autorisation tient compte des compétences des praticiens qui doivent être en mesure, d'après l'article 2131-1 du code de la santé publique (loi de bioéthique) d'en fournir les preuves. Lorsque le laboratoire dépend d'un établissement de santé, l'autorisation est délivrée à cet établissement.

La preuve des compétences est établie d'après 2 textes de loi :

- Décret n° 2015-245 du 2 mars 2015 fixant les critères de compétence des praticiens biologistes exerçant au sein de structures autorisées pour pratiquer des activités de diagnostic prénatal :

Sont réputés être en mesure de prouver leur compétence pour réaliser un ou plusieurs des examens de biologie médicale mentionnés à l'article R. 2131-1 (Prénatale) les praticiens répondant aux conditions de formation et d'expérience cumulatives suivantes :

« 1° Etre biologiste médical au sens des articles L. 6213-1, L. 6213-2 ou L. 6213-2-1 ;

« 2° Posséder un diplôme universitaire dans les spécialités biologiques relatives au diagnostic prénatal et dans les conditions précisées par arrêté du ministre chargé de la santé ;

« 3° Justifier de conditions de durée et de nature d'expérience permettant de réaliser les activités biologiques de diagnostic prénatal dans les conditions définies par ce même arrêté.

« II.-Sont également réputés être en mesure de prouver leur compétence pour exercer ces activités biologiques en diagnostic prénatal pour une durée maximale d'un an, renouvelable une fois, les biologistes médicaux satisfaisant aux conditions mentionnées au 1° du I et inscrits en vue d'obtenir le ou les diplômes universitaires mentionnés au 2° du I, ne satisfaisant pas aux conditions d'expérience mentionnées au 3°, à condition de pouvoir faire appel dans leur exercice, en tant que de besoin, à un biologiste médical justifiant de l'ensemble des conditions mentionnées au I et exerçant au sein de la même structure.

- L'arrêté du 5 mars 2018 fixant les conditions de formation et d'expérience des biologistes médicaux exerçant les activités de diagnostic prénatal mentionnées à l'article L. 2131-1 du code de la santé publique :

Concernant les examens de biologie médicale mentionnés à l'[article R. 2131-1 du code de la santé publique](#), sont réputés être en mesure de prouver leur compétence les biologistes médicaux mentionnés à l'article R. 2131-3 de ce même code qui justifient des conditions cumulatives de formation et d'expérience suivantes :

...

II. - Pour les examens de cytogénétique, y compris les examens moléculaires appliqués à la cytogénétique mentionnés au 1° du II de l'article R. 2131-1 :

1° Ils possèdent un diplôme en cytogénétique délivré par une université ou disposent de la reconnaissance prévue à l'article L. 6213-2, dans le domaine de spécialisation correspondant ;

2° Ils disposent d'une expérience minimale de trente-six mois, dont douze pour la réalisation des examens concernés dans une structure autorisée à cet effet.

Pour obtenir l'autorisation de diagnostic prénatal mentionnée à l'article R2131-5-5, l'établissement public de santé ou le laboratoire d'analyse de biologie médicale doit en outre disposer d'une pièce destinée aux entretiens avec les familles concernées par le diagnostic prénatal ([Art. R2131-6](#) du Code de la Santé Publique).

2. INFORMATION ET CONSENTEMENT DE LA PATIENTE

Le consentement de la personne et l'attestation de consultation du prescripteur sont obligatoires. (Arrêté du 25 janvier 2018)

3. ECHANTILLONS

3.1. Prélèvement

La quantité et l'aspect de l'échantillon doivent être notés.

La quantité optimale de prélèvement pour la réalisation d'un caryotype foetal est de :

- ≥ 15 ml de liquide amniotique,
- ≥ 1 ml de sang foetal sur héparine. L'absence de contamination du sang foetal par du sang maternel doit être contrôlée,
- 20 mg de villosités choriales.

Si l'échantillon est en quantité insuffisante et/ou mélangé à du sang ou à de la caduque en forte proportion, mais qu'il répond aux critères d'acceptabilité défini par le laboratoire, le risque de contamination devra être mentionné en cas de caryotype féminin normal après culture.

3.2. Identification et information

En plus des renseignements habituels (Cf. partie commune), les prélèvements foetaux doivent être accompagnés :

- des antécédents obstétricaux,
- de la date des dernières règles ou du début de grossesse,

et selon l'indication :

- le compte-rendu de l'échographie et le nom de l'échographiste,
- le résultat des marqueurs sériques et/ou de l'ADNlcT21,
- en cas de remaniement chromosomique d'un des conjoints ou lors d'une grossesse précédente, du résultat du compte rendu de caryotype de celui-ci.

4. EXAMEN CYTOGÉNÉTIQUE

4.1. Avant Culture

Avant la réalisation d'un caryotype il est possible de réaliser une technique dite « rapide » par FISH ou qPCR sur amniocytes non cultivés afin de rendre un résultat plus rapidement concernant les aneuploidies (13,18,21).

nombre de noyaux à analyser : 100 noyaux

Si le liquide est sanglant cette analyse pourra ne révéler que les cellules maternelles. La culture sera à privilégier pour l'interprétation

4.2. Culture

La mise en culture se fera selon les procédures écrites et disponibles au laboratoire. L'ensemencement doit se faire échantillon par échantillon.

La culture se fera en double (**MINIMUM 2 BOITES DE CULTURE** ensemencées avec 2 milieux différents de façon à éviter les contaminations manuelles, **dans 2 incubateurs différents**). La culture sera maintenue jusqu'au compte-rendu écrit de l'ensemble des examens pouvant nécessiter l'utilisation des cellules.

Milieux différents = milieux reconstitués à partir de deux flacons source différents livrés par un fournisseur. Si le flacon source est aliquoté au laboratoire, deux aliquots du même flacon source ne peuvent être considérés comme des milieux différents.

4.3. Marquage en bandes

Le laboratoire de cytogénétique doit maîtriser deux techniques de marquage complémentaires: RHG et GTG ou GTL ou QFQ, ainsi que les marquages en bandes QFQ (ou DA-DAPI), CBG, coloration NORs ou équivalent (FISH).

Pour chaque caryotype, le marquage en bandes (RHG ou/et GTG ou GTL ou QFQ) est obligatoire et doit être réalisé avec un niveau de résolution adapté aux indications (cf annexe 6). La mise en évidence de certaines anomalies de structure est facilitée par l'examen des deux types de marquage RHG et GTG/QFQ/GTL. Si cela est nécessaire à l'interprétation, les techniques complémentaires de cytogénétique (bandes CBG, NOR...) ainsi que les techniques de cytogénétique moléculaire seront mentionnées sur le rapport de résultat(s). Elles peuvent être réalisées dans un deuxième temps.

4.4. Liquide Amniotique (Conditions optimales)

La méthode *in situ* est à privilégier. Si seule la méthode par trypsination est réalisée, elle doit se faire à partir de flacons comportant au total au moins 12 colonies ; en dessous de 12 colonies exploitables, la validité du résultat doit être appréciée par le cytogénéticien responsable en fonction de l'indication et le compte rendu doit mentionner le nombre limité de clones analysés.

Méthode *in situ* :

- 12 métaphases analysées sur au moins 12 colonies différentes provenant de 2 cultures distinctes
- 3 caryogrammes établis

L'analyse d'une métaphase comprend au minimum le décompte du nombre de chromosomes et l'identification des gonosomes.

Après trypsination seule ou associée à de l'*in situ* :

- 15 métaphases analysées provenant de 2 boites de culture
- 3 caryogrammes établis

La technique de FISH pourra être réalisée comme pour les cellules sanguines pour rechercher des dérivés de translocation ou tout autre anomalie.

4.5. Villosités Chorales (Conditions optimales)

Document associé : "[Arbre décisionnel : caryotypes sur villosités chorales](#)"

L'analyse en deux temps associant un examen rapide et une culture à long terme est souhaitable.

Le choix de la technique rapide est laissé au choix du cytogénéticien : FISH, PCR ou caryotype conventionnel direct.

Dans le cas où la quantité du matériel reçu ne permettrait pas les deux analyses, **l'analyse de l'axe mésenchymateux doit toujours être privilégiée.**

S'il existe une indication de diagnostic en génétique moléculaire, l'ADN doit être obtenu directement à partir des villosités si la quantité de l'échantillon et la quantité d'ADN extrait le permettent et le laboratoire doit vérifier l'origine foetale du prélèvement (idéalement recherche de la contamination maternelle par génétique moléculaire).

La technique de FISH pourra être réalisée comme pour les cellules sanguines pour rechercher des dérivés de translocation ou tout autre anomalie.

Analyse directe :

- 12 métaphases analysées et 3 caryogrammes établis
- ou
- 50 à 100 noyaux en FISH (minimum 50)
- ou
- PCR

Culture :

- 12 métaphases analysées
- 3 caryogrammes établis

Technique double (caryotype direct + culture) :

- Au moins 20 métaphases au total dont au moins 6 sur culture
- 2 x 3 caryogrammes établis

Technique double (FISH/PCR + culture) :

- 12 métaphases au total issues de deux boîtes de culture
- 3 caryogrammes établis

Le rapport de l'analyse directe doit indiquer qu'il s'agit d'un résultat partiel et/ou que l'examen ne sera complet qu'après l'obtention des résultats de l'analyse de l'axe mésenchymateux.

Une discordance entre l'analyse directe (ou rapide) et la culture devra être mentionnée et interprétée en fonction du contexte.

4.6. Sang Foetal (Conditions optimales)

- 15 métaphases analysées
- 3 caryogrammes établis

4.7. Mosaïque

Pseudo mosaïque (accident de culture) versus mosaïque vrai

La découverte d'une cellule présentant une anomalie peut imposer des investigations complémentaires afin de distinguer une pseudomosaïque d'une mosaïque vraie. Selon le type d'anomalie trouvée et le chromosome impliqué, soit l'examen sera complété par l'analyse d'autres cellules provenant de flacons de culture distincts, soit des investigations supplémentaires seront envisagées. Un protocole écrit de conduite à tenir en fonction des anomalies observées doit exister dans chaque laboratoire. Un résumé de l'article de Hsu paru dans Prenatal Diagnosis peut servir de base à ce protocole ([Annexe 4](#)).

Une pseudomosaïque ne doit pas figurer dans le compte-rendu final. Quand elle concerne des chromosomes soumis à empreinte, la découverte d'une mosaïque doit faire discuter la recherche d'une disomie uniparentale.

Cas particulier des mosaïques confinées au placenta

Lors d'une biopsie de trophoblaste, une mosaïque confinée au placenta (MCP) doit être évoquée soit devant la découverte d'une ou plusieurs cellules discordantes soit devant une discordance entre le direct et la culture (cf "[Arbre décisionnel : caryotypes sur villosités choriales](#)")

Un contrôle sur liquide amniotique doit être discuté. Quand elle concerne des chromosomes soumis à empreinte, la découverte d'une mosaïque confinée au placenta doit faire discuter la recherche d'une disomie uniparentale.

5. ANALYSE PAR FISH OU AUTRES TECHNIQUES DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE (QF-PCR, QMPSF, ADNLc...) OU PAR ACPA

Voir guide de bonnes pratiques spécifique

Elles peuvent être proposées en fonction des conditions d'indication et d'interprétation. Pour les techniques ciblées, le rapport de résultats doit indiquer qu'il s'agit de résultats partiels ne donnant un renseignement que sur les loci testés, que ce type d'analyse ne remplace en aucun cas le caryotype qui sera fait obligatoirement par ailleurs. Il est à noter que les techniques QF-PCR et QMPSF ou MLPA, ADNLc sont soumises à l'agrément de Génétique Moléculaire (agrément non limité ou limité aux analyses de biologie moléculaire appliquées à la cytogénétique)

Ces techniques rapides doivent systématiquement être associées à une analyse pan-génomique. Si une ACPA est réalisée, un caryotype associé n'est pas indispensable.

6. RECOMMANDATIONS EN CAS D'ANOMALIE DE STRUCTURE

Il est recommandé en cas d'anomalie de structure non récurrente *de novo* de confirmer le nombre et les partenaires impliqués par des peintures chromosomiques éventuellement associées à des sondes loci-spécifiques. En cas de signe d'appel échographique associé, une ACPA est recommandée.

Dans le cadre d'une anomalie familiale, le nombre et les partenaires impliqués doivent avoir été vérifié sur un porteur de l'anomalie familiale. Si il existe des signes échographiques ou cliniques, les techniques de cytogénétique moléculaire doivent confirmer qu'il s'agit, à ce niveau de résolution, d'un remaniement semblable à celui du parent porteur.

7. DISOMIE UNIPARENTALE

Les techniques de génétique moléculaire recherchant une éventuelle disomie uniparentale sont à considérer selon les données de la littérature. Ces techniques complémentaires sont à considérer quand un chromosome soumis à empreinte parentale est impliqué dans un remaniement de structure, dans une anomalie de nombre en mosaïque (éventuellement confinée au placenta).

La recherche d'une disomie uniparentale du chromosome 14 ou du chromosome 15 en cas de translocation robertsonienne impliquant un de ces deux chromosomes n'est pas indispensable en l'absence de manifestations échographiques en raison du risque très faible de DUP dans cette situation (K Moradkhani et al., Prenat Diagn. 2019 Oct;39(11):986-992). L'intérêt d'une recherche de DUP 15 pat responsable d'un syndrome d'Angelman doit être discuté avec les parents lors de la consultation prénatale.

8. RÉSULTATS

Le résultat doit être rendu autant que possible dans un délai de 14 jours après le prélèvement (en dehors des analyses complémentaires éventuellement déclenchées).

Le compte-rendu contiendra les informations suivantes :

- les modalités de culture (*in situ* et/ou trypsination) ainsi que le nombre de chambres de culture utilisées,
- le(s) type(s) de marquage en bandes utilisé(s),
- le nombre de clone examinés en cas de culture *in situ*,
- le nombre total de métaphases examinées,
- le nombre de caryogrammes établis,
- la résolution globale obtenue,
- si la qualité de l'examen est en dessous des standards fixés (cf annexe 6), cela doit être signalé et les limites du résultat expliquées.

La résolution globale correspond à la résolution obtenue pour les deux meilleurs caryogrammes [voir annexe 1]

En cas d'anomalie, celle-ci sera décrite : type de remaniement, aspect apparemment équilibré ou déséquilibré pour les remaniements de la structure chromosomique, caractère homogène ou en mosaïque, chromosomes et bras chromosomiques impliqués.

Un commentaire sur les conséquences médicales du résultat signalera

- les conséquences phénotypiques des anomalies observées sans obligatoirement décrire de façon détaillée le phénotype (ex citer le nom du syndrome). Les

conséquences phénotypiques pourront être détaillées dans un courrier joint au résultat,

- la nécessité éventuelle d'examens complémentaires (en biologie moléculaire, par exemple),
- la nécessité éventuelle d'une étude familiale ou d'une consultation de génétique chromosomique.

(cf. arbres décisionnels)

IV. CYTOGENETIQUE HEMATOLOGIQUE

A. INTRODUCTION

Ce chapitre a été rédigé par des membres du Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH).

Ce document est un recueil des conditions proposées pour réaliser l'exploration cytogénétique d'une hémopathie maligne. Son élaboration est fondée sur les principes énoncés dans l'introduction générale de ce guide. Il doit être considéré comme une référence modulable et non comme une règle rigide.

Les Évaluations Externes de la Qualité proposés annuellement par le GFCH permettent d'évaluer les pratiques professionnelles et la qualité des laboratoires participants. Le GFCH recommande également la réalisation de comparaisons inter-laboratoires.

B. CONDITIONS D'EXERCICE

Le responsable du laboratoire doit avoir, en plus des titres réglementaires pour l'exercice de la Cytogénétique, des connaissances en Hématologie permettant d'assurer l'interprétation correcte des résultats.

L'exercice de la cytogénétique hématologique n'est pas soumis à agrément mais régi selon les modalités décrites dans la [loi n°442-2013 du 30 mai 2013](#) relative à la réforme de la biologie médicale.

Pour la pratique de la cytogénétique hématologique, en accord avec les conditions précisées dans les articles L6213-1, L6213-2 et L6213-3 de cette loi, l'exercice peut être assuré par une personnalité scientifique.

C. RÉALISATION DES EXAMENS

1. PRÉLÈVEMENT, ACHEMINEMENT ET RÉCEPTION DES ÉCHANTILLONS

1.1. Prélèvement

Les conditions de stérilité doivent être respectées.

Pour les échantillons tels que moelle osseuse, sang, liquides d'épanchement :

- Prélèvement avec une seringue héparinée (héparine sans conservateur toxique pour les cellules)
- Recueil dans un tube ou flacon hépariné ; pour la moelle le recueil peut être effectué dans un flacon contenant du milieu de culture avec 10 à 20 UI/ml d'héparine sodique

Pour les liquides d'épanchement : sur tube ou flacon sec ou hépariné.

Pour les échantillons solides tels que ganglions, rate..., l'échantillon doit être mis de préférence dans un milieu de culture, à défaut dans un milieu de transport (tamponné stérile tel que PBS, Hanks « milieu de transport », à défaut sérum physiologique), afin de préserver la viabilité cellulaire.

Tous les prélèvements doivent être acheminés au laboratoire le plus rapidement possible, de préférence dans les 24h. Cependant, le délai maximum toléré pour l'acheminement des échantillons provenant de correspondants éloignés peut s'étendre à 48h (voire 72h dans certains cas). Chaque laboratoire doit définir ses propres conditions d'acceptation des prélèvements.

Les échantillons sont conservés à température ambiante jusqu'à la mise en culture.

1.2. Fiche de renseignements

L'échantillon doit être accompagné de la fiche de renseignements cliniques. Ceux-ci doivent préciser le ou les diagnostic(s) évoqué(s) ou le diagnostic connu de la maladie.

En complément, peuvent être renseignés les données suivantes :

- Le stade de la maladie, les traitements reçus ou en cours, l'inclusion dans un protocole thérapeutique, les résultats de l'hémogramme le plus récent en mentionnant la date,
- L'existence de caryotypes antérieurs effectués dans d'autres laboratoires.

1.3. Réception

Il faut vérifier la conformité de l'échantillon (identitovigilance, contenant, contenu, délai d'acheminement, feuille de demande...) et tout critère de non-conformité pré-analytique défini par le laboratoire.

2. EXAMEN CYTOGÉNÉTIQUE

2.1. Cytogénétique conventionnelle

2.1.1. Culture

La mise en culture est effectuée stérilement et le choix des conditions de culture tiendra compte du type d'hémopathie (cf annexe 5). La numération des cellules /ml de l'échantillon est fortement recommandée. La qualité d'un prélèvement pourra être appréciée par la réalisation d'un test de viabilité des cellules, notamment en cas de transport prolongé. L'ensemencement sera effectué en respectant les concentrations recommandées (dépendantes des pathologies). La culture est effectuée dans des incubateurs à 37°C sans ou de préférence avec CO2 5%.

Il est possible de synchroniser les cultures pour améliorer la qualité voire la quantité des métaphases analysées.

2.1.2. Analyse

Le nombre de mitoses à analyser peut varier en fonction du stade de la maladie.

2.1.2.1. Au diagnostic

- Il est nécessaire, en l'absence d'anomalie détectée, d'analyser (comptage et identification des chromosomes) au moins 20 mitoses et de classer 4 à 5 caryotypes.
- En cas d'anomalie, le nombre minimum de mitoses à analyser doit permettre d'établir la clonalité du ou des clone(s) anormal(aux)-
- Dans certaines pathologies où la présence d'anomalies additionnelles et/ou la complexité du caryotype est prise en compte, il est nécessaire d'analyser au moins 20 mitoses pour rechercher un ou plusieurs clones anormaux

- En cas d'anomalie non clonale, et selon sa nature et le contexte clinique, il peut être souhaitable de confirmer ou d'infirmer une éventuelle clonalité, en poursuivant, soit au microscope, la recherche de métaphases supplémentaires, soit en réalisant une étude en cytogénétique moléculaire avec une sonde spécifique de l'anomalie suspectée.

2.1.2.2. Lors du suivi

Pour la recherche d'une anomalie préalablement décelée, et en fonction du contexte clinique, il est possible d'augmenter la sensibilité de l'analyse en augmentant le nombre de métaphases à analyser, et/ou en réalisant une recherche par cytogénétique moléculaire.

A noter que dans de nombreuses pathologies, il n'y a pas d'indication de suivi par cytogénétique de la maladie résiduelle (cf recommandations du GFCH, ABC, 2016, Référentiel SFH et Guide de Juste Prescription RuBIH 2010)

2.1.2.3. Non réalisation de l'analyse

Le cytogénéticien peut décider de ne pas réaliser l'analyse si elle n'est pas pertinente : par exemple lorsque les données cliniques, biologiques et/ou anatomopathologiques ne sont pas en faveur d'une hémopathie ou si dans le suivi d'une maladie résiduelle, une autre technique de biologie moléculaire plus sensible est réalisée en parallèle.

Deux situations sont alors possibles :

- mise en culture avec conservation du culot de cytogénétique (permettant une éventuelle analyse ultérieure +++), à privilégier si prélèvement précieux. Il conviendra de mentionner sur le compte-rendu d'analyse que le culot a été conservé.
- ou annulation complète de l'analyse (de préférence avec l'accord du prescripteur), si l'on est sûr que l'analyse n'est pas adéquate.

2.1.3. Interprétation de l'analyse cytogénétique

A ce stade, toutes les données hématologiques doivent être connues (hémogramme, myélogramme, immunophénotypage...) pour permettre l'interprétation de l'analyse cytogénétique et pour poser l'indication d'éventuelles investigations complémentaires (FISH, Biologie moléculaire...).

Il est de la responsabilité du cytogénéticien d'évaluer la nature des données pertinentes nécessaires à cette interprétation.

2.1.4. Conservation des culots cytogénétiques

Compte tenu de l'évolution rapide des connaissances et des techniques, et du caractère unique du matériel conservé, les culots cytogénétiques (au minimum ceux de l'examen diagnostique) doivent pouvoir être conservés, même si le caryotype est normal, pour d'éventuels compléments d'études nécessaires à la précision du diagnostic.

Le délai de conservation des culots, lames blanches et lames dénaturées est laissé à l'appréciation du cytogénéticien responsable.

2.2. Cytogénétique moléculaire

2.2.1. Conditions générales

Les recommandations ont été énoncées dans le chapitre I-B.5.2.

De plus, la sensibilité et la qualité d'hybridation doivent être évaluées pour chaque type de préparation (matrice) selon le mode opératoire du laboratoire :

- Etalement cytogénétique,
- Frottis de sang ou de moelle, empreinte ganglionnaire ou tumorale, cytopspin,
- Coupe issue de tissus cryopréservés ou paraffinés (voir chapitre spécifique).

2.2.2. Modalités d'interprétation des techniques

Une fiche de lecture reportant les conditions d'analyse et la qualité du signal doit être rédigée et conservée. Une double lecture des lames au microscope est recommandée en cas de difficulté d'interprétation. En cas d'automatisation de lecture, une vérification des images informatisées peut suffire.

- **Pour la FISH métaphasique :**

Pour la détection de translocations, délétions, duplications, insertions à l'aide de sondes spécifiques de régions chromosomiques, l'interprétation des résultats doit tenir compte de l'efficacité de l'hybridation et faire l'objet d'un **décompte conservé**.

Le nombre de mitoses observé en FISH peut être inférieur à 10, parfois contraint par le faible potentiel mitotique observé dans certaines hémopathies. De plus, le nombre de mitoses observé en FISH peut être adapté aux données du caryotype : confirmation de l'anomalie récurrente détectée sur le caryotype, précision d'une anomalie, preuve de l'existence d'un clone...

- **Pour la FISH interphasique :**

Le comptage dépend de l'automatisation ou non du laboratoire, des difficultés d'interprétation, de l'exiguïté et/ou du caractère critique du matériel (voir également partie commune chapitre 5.2) :

1- Nombre de lecteurs :

En l'absence d'automate, sont conseillés :

- En l'absence de difficulté d'interprétation : 1 lecteur,
- En cas de difficulté d'interprétation : 2 lecteurs

b) En cas d'automatisation, sont conseillés :

- En l'absence de difficulté d'interprétation : vérification des images par une personne
- En cas de difficulté : lecture au microscope associée

2- Nombres de noyaux lus :

Il est impératif de compter un nombre suffisant de noyaux si la préparation le permet. Un nombre minimum de 100 noyaux est recommandé. Ce nombre peut être modulé en fonction de la pathologie, de la proportion de cellules tumorales, du type de sonde voire du stade. En cas de préparation pauvre obtenue à partir d'un échantillon précieux, un nombre inférieur de noyaux peut suffire, surtout en cas de détection de l'anomalie.

Il est important de pouvoir confronter les résultats de la FISH interphasique avec ceux de la FISH métaphasique et du caryotype pour une interprétation correcte des résultats.

La vérification de la localisation et de l'intensité du (des) signal(aux) de la (des) sonde(s) sur métaphase est recommandée (si techniquement possible) et constitue un contrôle qualité interne de l'échantillon.

2.2.3. Archivage et stockage

Pour la FISH métaphasique, il est recommandé de conserver au moins une mitose par clone anormal et une mitose normale, si cette dernière est détectée. Le choix du support est libre. Pour la FISH interphasique, il est souhaitable de conserver au minimum une image de chaque sonde hybridée. Le choix du support est libre. La durée de conservation des lames hybridées est laissée à l'appréciation des biologistes.

2.2.4. Détermination du seuil de positivité technique d'une sonde (sensibilité analytique)

Le seuil devra être déterminé par type de sonde et par matrice cellulaire :

- Culot de cytogénétique,

L'établissement du seuil de positivité sur culots de cytogénétique nécessite plusieurs témoins (dont 2 de sexe masculin afin d'éviter une hybridation croisée avec une séquence du chromosome Y) de prélèvements sanguins et/ou médullaires, qu'il est possible de pooler. Deux techniques FISH au minimum sont réalisées pour une lecture d'un total de 2000 noyaux recommandée. Une double lecture, dans ce cas précis d'établissement du seuil, est indispensable. Le calcul du seuil s'effectue soit par la formule : moyenne + 3DS (Déviation Standard) ou selon la loi binomiale (fonction CRITBINOM dans Excel, cf référence ci-dessous).

- Frottis-empreinte-cytospin.

Chaque laboratoire devra déterminer le témoin négatif qu'il utilise et le nombre de lames à passer et de noyaux à compter afin de déterminer ce seuil.

- Pour les coupes FFPE issues de tissu,

Ce sujet sera abordé dans la partie FISH sur coupe FFPE.

Références :

- Statistical Treatment of Fluorescence *in Situ* Hybridization Validation Data to Generate Normal Reference Ranges Using Excel Functions. Allison L. Ciolino, Mary E. Tang,* and Ron Bryant. *J Mol Diagn.* 2009 July; 11(4): 330–333.
- *Pathologie Biologie, Recommandations pour le diagnostic des hémopathies malignes, 2004*

2.2.5 La validation des sondes

La sensibilité et la spécificité sont testées par le fournisseur. A chaque changement de fournisseur ou de design de sonde, il conviendra de tester la localisation de la sonde sur métaphase ou la positivité de la sonde sur un cas témoin positif si c'est une anomalie récurrente.

3. RÉSULTATS

3.1. La formulation des résultats

Les formules sont rédigées indépendamment si des tissus différents ont été analysés (Cf Recommandations du document 2013 : Guide de nomenclature ISCN disponible sur le site de l'ACLF).

Le résultat de la FISH, outre les recommandations formulées dans la partie commune paragraphes 5 et 6 du chapitre B, doit spécifiquement préciser le matériel initial (suspension de cellules fixées, moelle, sang, ganglion, tumeur, cellules fixées...) et la date du prélèvement.

Pour les cellules interphasiques, le seuil de sensibilité technique des sondes FISH peut être notifié dans le compte-rendu.

3.2. Les commentaires et la conclusion

La conclusion décrira en clair la ou les anomalies les plus informatives : nombre modal, complexité, évolution clonale, anomalie spécifique, anomalie non clonale compatible avec la pathologie suspectée...

Les anomalies non clonales et/ou non spécifiques de la pathologie suspectée ne sont pas à évoquer systématiquement, ce point est laissé à l'appréciation de chacun en fonction des cas particuliers.

Une orientation diagnostique et pronostique pourra être proposée ainsi que des examens complémentaires appropriés (FISH, RT-PCR, ...)

Les limites de l'examen pourront être mentionnées, par exemple : le nombre de mitoses analysées inférieur à 20 ; la qualité du marquage chromosomique ; la richesse du prélèvement ; le pourcentage de cellules malignes dans l'échantillon correspondant à l'examen pouvant conduire à un biais de culture ; les non conformités pouvant s'avérer critiques pour l'obtention d'un résultat contributif....

3.3. Les points particuliers

En cas de doute sur la nature acquise d'une anomalie, la réalisation du caryotype constitutionnel peut être indiquée pour l'interprétation finale du résultat sur le plan hématologique et sur le plan du risque constitutionnel (risque possible pour le patient et/ou ses apparentés de malformations, fausses couches, tumeurs, stérilité...).

On peut éliminer une anomalie constitutionnelle si elle disparaît sur le caryotype de suivi mais il est recommandé de ne pas affirmer sa nature constitutionnelle sans vérification.

Cette étude du caryotype constitutionnel requiert le consentement du patient et doit être réalisée dans les conditions prévues à l'article R. 1131-4.

Il conviendra de faire apparaître le doute sur la nature acquise de l'anomalie dans la formule ISCN ("?c"), et de mentionner l'intérêt d'une analyse constitutionnelle avec consentement sur le compte-rendu.

Il est souhaitable de signaler un taux élevé de cassures chromosomiques (soit 3-4 mitoses sur 20 analysées pour une culture non synchronisée et le double pour une culture synchronisée).

4. DÉLAI DE RÉPONSE

Il est nécessaire de respecter un délai compatible avec la prise en charge optimale du patient et le maintien de la qualité des examens. Les délais de réponse sont variables et doivent être adaptés à la pathologie et au degré d'urgence.

Pour une analyse au diagnostic, selon les pathologies suivantes, les délais moyens optimaux suivants sont souhaitables :

- Inférieur ou égal à 7 jours pour les leucémies aiguës et les lymphomes de Burkitt,
- Inférieur ou égal à 14 jours pour les leucémies myéloïdes chroniques,
- Inférieur ou égal à 21 jours pour les autres pathologies myéloïdes chroniques,
- Inférieur ou égal à 28 jours pour les pathologies lymphoïdes chroniques

5. ECHECS

En dehors des causes identifiées et connues (prélèvement non stérile, délai d'acheminement dépassé, contamination), le taux d'échec est lié pour la plus grande part à la qualité des échantillons (cellularité et capacité proliférative) et est très variable selon les pathologies. L'évaluation du taux d'échec et la recherche de leur cause doivent être menées afin de pouvoir mettre en place si possible les mesures correctives et préventives, nécessaires à leur limitation.

6. PARTICULARITÉS SELON LA PATHOLOGIE

6.1. Mise en culture

Voir tableau annexe 5

6.2. Indication de l'analyse cytogénétique conventionnelle et moléculaire

L'évolution très rapide des technologies et des connaissances et la potentialité de la disponibilité croissante d'outils à visée diagnostique pour une meilleure prise en charge thérapeutique rendent difficile l'établissement d'une liste précise d'indications, amenée à être réactualisée plus rapidement que ce guide.

Des recommandations pour la prise en charge cytogénétique des hémopathies ont été publiées en 2004 puis remises à jour en 2016 par le GFCH [Annales de Biologie Clinique 2016 Oct 1;74(5):509-595] et en 2019 par le Genomics Quality Assessment (GenQA) [Rack et al., Leukemia. 2019 Aug;33(8):1851-1867], avec réponse du GFCH [Nguyen-Khac et al., Leukemia, 2019 Dec 20].

En 2009, des représentants des cliniciens et des biologistes impliqués dans le diagnostic des hémopathies malignes ont élaboré un référentiel qui est accessible sur le site internet de la Société Française d'Hématologie (www.sfh.hematologie.net). En 2010 ont été publiés les guides de juste prescription du Réseau de biologie innovatrice en onco-hématologie (RuBIH), programme STIC 2004-9, Hématologie 2010 ; 16 (supplément 4) : 81-101.

A visée diagnostique, la FISH métaphasique est, en règle, utilisée comme un complément de l'analyse en cytogénétique conventionnelle :

- Pour l'identification précise de remaniements incomplètement élucidés en cytogénétique conventionnelle, de marqueurs ou d'anomalies complexes
- Pour la recherche d'anomalies ciblées dans certains cas de discordance cytologique et/ou immunophénotypique et cytogénétique
- Pour la mise en évidence, compte tenu de leur impact pronostique, de certaines anomalies non détectées ou non détectables par l'analyse conventionnelle (anomalies cryptiques)

6.3. Cytogénétique du myélome multiple

Etant donné la faible capacité proliférative des plasmocytes et le faible seuil de la plasmocytose médullaire d'un myélome (10%), la technique de référence d'étude cytogénétique des myélomes est représentée par la FISH interphasique sur préparation enrichie en plasmocytes. Les critères de pureté de la préparation et les cibles FISH recommandées sont définis dans les recommandations du GFCH (Ann Biol Clin 2016 ; 74 (5) : 588-95) et doivent tenir compte de l'identification de nouvelles cibles moléculaires à visée théranostique dans cette hémopathie.

V. HYBRIDATION IN SITU SUR COUPE REALISEE APRES INCLUSION EN PARAFFINE ou CRYOCOUCPE

A. INTRODUCTION

Ce chapitre va traiter des particularités inhérentes à la fixation en formol et l'inclusion en paraffine ou à la congélation imposant des adaptations techniques, d'analyse et d'interprétation.

B. CONDITIONS D'EXERCICE

Cette technique est réalisée soit en anatomie pathologie, soit en cytogénétique en coopération avec les pathologistes.

C. RÉALISATION DES EXAMENS sur FFPE

1. MATERIEL

1.1. Pré-requis pré-analytique

Les échantillons peuvent être des fragments biopsiques ou des pièces opératoires fixés et inclus en paraffine ou des cyto-ponctions tumorales incluses en cytobloc.

Les échantillons seront accompagnés d'une demande d'examen mentionnant, en plus des éléments d'identification prescrits dans la norme

- La localisation du prélèvement
- La cellularité, en cas de cytoponction (si évaluée par le préleveur).

Les comptes-rendus anatomo- ou cytopathologiques doivent être transmis au laboratoire dans les meilleurs délais idéalement avec l'échantillon.

1.1.1. Préparation des blocs

- Délai de fixation (temps d'ischémie froide) le plus court possible :
 - biopsie : quelques secondes,
 - pièces opératoires : une demi-heure.
- Temps de fixation :
 - au moins 6h pour une biopsie
 - au moins 24h pour une pièce opératoire
- Fixation dans du formol tamponné à 10%, pH7 (fixation au Bouin interdite).
- Limiter au maximum l'ajout d'éosine au formol.
- Si prélèvement osseux une décalcification douce est possible, à l'EDTA 0,5 molaire pH8 pendant 48h à 37°C après fixation.
- Inclusion en paraffine, à température d'au maximum 56°C.

1.1.2. Les coupes

- épaisseur : entre 2 et 4µm.
- lames : chargées positivement (par exemple : superfrost +). Attention certaines lames bien que chargées ne fonctionnent pas. Se renseigner ou faire des tests avant d'en choisir une marque.

A proscrire :

- Eau albumineuse pour monter la coupe. Utiliser de l'eau distillée.
- une coupe sériée, colorée en HE, ou une immunohistochimie pertinente, est indispensable pour définir les zones d'intérêt (la lame d'hybridation in situ peut être gravée, au verso).
- conservation : Une fois les coupes faites, elles doivent être conservées à +4°C (conservation maximale un an) avant déparaffinage.

2. LA TECHNIQUE

2.1. Le déparaffinage et le prétraitement

- Déparaffinage : au minimum 3 x 5 mn dans le xylène ou équivalent (sous hotte). Ce déparaffinage doit être complet sans trace de paraffine identifiable à l'œil nu.
- Une fois le déparaffinage effectué, la technique est réalisée immédiatement, ou avec un délai le plus court possible (conservation à +4°C).
- Pré-traitement et digestion : se référer aux recommandations du KIT utilisé.

2.2. Les sondes

- la sensibilité et la spécificité sont testées par le fournisseur.
- Il pourrait convenir de tester la validité de la sonde sur un tissu témoin positif et négatif, au changement de design et/ou de lot.
- Faire attention, certaines sondes utilisées en hématologie, ne conviennent pas sur les coupes tissulaires.

3. LECTURE ET INTERPRETATION

3.1. Lecture

- Une double lecture dont une par un cytogénéticien ou un pathologiste est recommandée. En cas de discordance entre les deux lecteurs, une troisième lecture est recommandée
- Lire avec le contrôle morphologique. Une lecture d'une lame HES/IHC contiguë à la coupe utilisée pour la FISH est la première étape afin de repérer les zones d'intérêt.
- Il faut commencer par un criblage de la lame en entier et repérer les zones tumorales et des cellules tumorales dans les différentes zones d'intérêt (5 champs dans la zone d'intérêt). Importance de l'évaluation du pourcentage de cellules tumorales et de la corrélation avec les résultats obtenus.

- Nombre de noyaux à analyser : 50, à moduler suivant l'anomalie à détecter, la difficulté de lecture et l'hétérogénéité tumorale (entre 30 et 200 généralement).

3.2. Interprétation

- Le seuil de détection doit être adapté au prélèvement étudié (type tumoral, pourcentage de cellules tumorales, anomalie recherchée, données de la littérature) et limite de la technique. En l'absence de données dans la littérature, il conviendra de déterminer les seuils sur des lames contrôles de tissu normal par type de sonde.

D. RÉALISATION DES EXAMENS sur CRYOCOUPES

1. MATERIEL

Les prérequis concernant les informations sur le matériel transmis sont les mêmes que pour les coupes FFPE.

Les coupes

- épaisseur : entre 2 et 4µm.
- lames : chargées positivement (par exemple : superfrost +).
- une coupe sériée, colorée en HE est indispensable pour définir les zones d'intérêt (la lame d'hybridation in situ peut être gravée, au verso).
- conservation : Une utilisation dans la semaine suivant la coupe est recommandée.

2. LA TECHNIQUE

Le protocole pour les cryocoupes ne nécessite pas de traitement à chaud mais il est recommandé de prefixer les coupes dans une solution de Carnoy entre 5 et 15mn à RT. Une digestion enzymatique (pepsine ou protéase) est nécessaire.

Le protocole est ensuite celui utilisé pour l'hybridation in situ sur préparation chromosomique.

3. LECTURE ET INTERPRETATION

Ce sont les mêmes que pour la FISH sur FFPE.

E. ARCHIVAGE et COMPTE-RENDU

- Il sera archivé un minimum de deux images représentatives.
- La durée de conservation des lames hybridées est laissée à l'appréciation des biologistes/pathologistes.

Le pourcentage de cellules tumorales sera mentionné sur le compte-rendu si disponible.

La formule ISCN pourra être utilisée. Une conclusion énoncée en claire pour les cliniciens sera rédigée.

Il sera mentionné les limites de l'informativité de l'examen (faible cellularité tumorale, absence d'anomalie décelée...).

Le compte-rendu sera adapté à l'anomalie recherchée. Par exemple, les critères pour une définir une amplification varient d'un gène à l'autre ou les critères spécifiques pour une pathologie donnée /un gène donné (pour définir le seuil de positivité) doivent être justifiés par la bibliographie mentionnée dans le CR éventuellement).

A VENIR

VI CYTOGENETIQUE SUR SPERME (Sperm-FISH)

VII CYTOGENETIQUE EN DIAGNOSTIC PRE-IMPLANTATOIRE

Diagnostic Préimplantatoire par FISH

1. DEFINITION

Le diagnostic préimplantatoire (DPI) n'est autorisé qu'à titre exceptionnel, selon des conditions édictées dans le Code de la Santé Publique, article L 2131-4 et associés.

Le DPI est réalisé à partir de cellules prélevées sur l'embryon in vitro pour des couples ayant une forte probabilité de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique incurable d'une particulière gravité. Le DPI ne peut que rechercher l'affection transmissible précisément identifiée au préalable.

Cette activité est soumise à autorisation et agréments par l'Agence de la Biomédecine.

2. INDICATIONS

Les examens de cytogénétique, y compris moléculaire, sur la ou les cellules embryonnaires sont indiqués principalement pour les anomalies chromosomiques pouvant donner un déséquilibre à l'origine d'une pathologie dans la descendance, en particulier :

- Translocations
- Délétions
- Inversions
- Insertions
- Maladies liées au sexe en l'absence de DPI par analyse moléculaire
- Certaines duplications, anomalies complexes, etc.

Pour chaque demande, un généticien de centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal doit attester que l'indication correspond bien aux conditions légales autorisant le recours au DPI.

3. REALISATION DU DPI PAR FISH

3.1. Travail préparatoire :

Une étude préliminaire est réalisée en se basant sur un caryotype de bonne qualité, éventuellement complété d'autres résultats de cytogénétique montrant l'anomalie.

Les différents déséquilibres possibles sont listés et la viabilité de chacun est évaluée, dans la mesure du possible, en tenant compte des éventuelles non-disjonctions en méiose 1 ou 2 et, pour certaines anomalies, des recombinaisons possibles.

Un ensemble de sondes est choisi afin de pouvoir mettre en évidence en interphase tous les déséquilibres possibles ou, si ce n'est pas réalisable, afin de visualiser avec certitude les déséquilibres les plus viables.

Minimum préconisé :

- Pour les translocations robertsoniennes, une sonde sur le bras long de chacun des chromosomes ;

- Pour les translocations réciproques, trois sondes : deux sur un chromosome de chaque côté d'un point de cassure, une sur l'autre ;
- Pour les délétions : une sonde dans la région causale et une sonde témoin à distance ;
- Pour les inversions péricentriques : deux sondes, de part et d'autre de la région inversée ;
- Pour le sexage : une sonde du X et une du Y, centromériques de préférence.

Le mélange de sondes est vérifié. L'hybridation est réalisée avec les méthodes testées et validées dans le laboratoire, par du personnel formé et habilité.

Dans tous les cas, les sondes doivent être testées en mélange sur au moins 10 métaphases et 100 noyaux du patient, du partenaire si possible (surtout pour les régions polymorphes, satellites par ex.), éventuellement d'autres témoins, des cellules obtenues à partir d'embryons issus de Fécondation In Vitro à détruire par exemple.

Le laboratoire doit déterminer ses critères de comptage des spots. Dans le cas le plus simple, deux signaux de taille attendue, distants d'au moins la taille d'un signal, sont considérés comme deux spots. Il y a beaucoup d'autres dispositions possibles à envisager. L'efficacité d'hybridation de chaque sonde doit être évaluée et montrer les signaux attendus dans au moins 95% des noyaux examinés.

Ces hybridations permettent d'évaluer les taux d'erreurs a priori, faux positifs et faux négatifs, attendus pour les analyses sur embryons. Cette information sur le risque d'erreur doit être disponible et communiquée aux patients et aux praticiens qui les prennent en charge.

3.2. Le Diagnostic Préimplantatoire :

A partir de cette étape, les déplacements d'embryons ou de cellules et les étapes critiques des analyses sont supervisés afin de garantir l'identification des résultats.

3.2.1. Biopsie embryonnaire :

Elle doit être réalisée au laboratoire de FIV par du personnel formé et habilité.

La biopsie se fait habituellement au 3^{ème} jour post fécondation, stade morula, ou aux 5^{ème} - 6^{ème} jours au stade blastocyste (biopsie de trophectoderme).

Nombre de cellules à prélever :

- Une seule cellule mononucléée peut suffire s'il y a deux sondes informatives pour chaque déséquilibre présentant une certaine viabilité, ou pour le sexage ;
- Sinon, deux cellules à J3 ;
- 5 à 10 cellules, de préférence, si biopsie de trophectoderme.

3.2.2. Préparation des échantillons :

Cette étape doit être réalisée par du personnel formé et habilité.

Les lames sont identifiées par un système permettant de relier sans ambiguïté l'échantillon à l'embryon et au couple.

Les cellules prélevées sont déposées sur lames et lysées. Le noyau est libéré et fixé.

Les lames peuvent être observées avant hybridation afin de localiser les noyaux ce qui permettra de les retrouver plus rapidement lors de la lecture.

Des lames sont préparées à partir de culots de patients, éventuellement d'autres témoins, à des fins de contrôle.

3.2.3. Hybridation et lecture :

L'hybridation, les lavages et le montage sont faits selon les protocoles établis et validés par le laboratoire, par du personnel formé et habilité.

La lecture est effectuée par au moins deux personnes formées et habilitées.

Les lames de patients et de témoins permettent de valider les contrôles internes : qualité et position des sondes, niveau de bruit de fond.

Le nombre de spots fluorescents est noté pour chaque noyau d'embryon. Une image est capturée pour chaque noyau analysé.

Il existe souvent des difficultés lors de la lecture et pour l'interprétation des signaux. Le principal facteur de variation de la FISH étant la qualité de l'ADN embryonnaire qui est très variable. Une hybridation de secours ou une nouvelle biopsie peuvent être envisagées si la qualité des signaux est insuffisante.

4. RESULTATS

4.1. Interprétation des signaux :

Il s'agit de déterminer si l'embryon analysé est « génétiquement transférable ».

Si une seule cellule mononucléée est analysée pour un embryon, la principale source d'erreur diagnostique est la superposition de signaux qui pourrait faire croire à une formule équilibrée alors qu'il y a en réalité une trisomie. La probabilité de cet événement est déterminée d'après les taux d'erreurs relevés lors des travaux préparatoires.

Une proportion non négligeable d'embryons est sujette à des anomalies lors des premières mitoses, en particulier les 3 ou 4 premiers jours post fécondation, aboutissant à des aneuploïdies variables d'une cellule à l'autre, plus visibles lorsque plusieurs sont analysées. Ces embryons « chaotiques » ne sont pas transférables.

Certains embryons ont une mosaïque chromosomique qui peut être suspectée par une analyse portant sur plusieurs cellules. Il faut tenir compte de la difficulté de comptage des signaux qui induit une augmentation des discordances avec le nombre de cellules observées.

Certaines des lignées anormales ne peuvent perdurer, laissant alors évoluer une lignée équilibrée. Moyennant information et accord des patients, les embryons mosaïques pour lesquels les lignées anormales ne prédisposent pas à un risque particulier peuvent être transférés.

Le laboratoire doit déterminer sa conduite à tenir pour l'évaluation des embryons avec mosaïque.

4.2. Compte-rendu :

En plus des informations habituelles, le compte-rendu doit comporter :

- La date de la biopsie ;
- L'identification précise de chaque embryon (données identifiantes utilisables : code, cycle de FIV, date de ponction ovocytaire...)
- Le résultat de l'analyse et son interprétation ;
- Lorsque cela s'applique, une mention stipulant que le DPI par FISH ne peut différencier les embryons normaux de ceux qui portent l'anomalie équilibrée ;
- Éventuellement, l'indication d'un Diagnostic Prénatal pour confirmer le résultat du DPI ;
- Un ordre de priorité pour le transfert peut être indiqué (par exemple en fonction du nombre de cellules lisibles) ;
- La signature par un praticien agréé.

Ce compte-rendu est destiné au service qui pratiquera le transfert.

5. EVALUATION DE LA QUALITE

Diverses évaluations permettent la surveillance et le maintien des performances de la technique.

5.1. Conservation des lames :

Les lames correspondant à des embryons cryopréservés ou qui ont donné une grossesse suite à un transfert peuvent être conservées au moins quelques mois à basse température, pour d'éventuelles vérifications. La conservation des autres lames n'est pas utile.

5.2. Réanalyse :

Les embryons non transférables, parce qu'ils sont porteurs d'une anomalie ou parce qu'ils ne sont pas de qualité suffisante pour être transférés, peuvent être analysés afin de contrôler les résultats observés lors du DPI et de vérifier les performances de la technique.

5.3. Suivi des tentatives :

Un rapport destiné à L'Agence de la Biomédecine est rédigé chaque année. Il porte sur la quantité et le type d'analyses préparées et effectuées, sur le suivi de transferts, le suivi des grossesses et des naissances, les résultats des analyses pré et post natales effectuées.

5.4. Contrôle Qualité :

Le laboratoire doit participer à un programme de comparaison interlaboratoires, une évaluation externe de la qualité ou bien fournir la preuve objective permettant de déterminer l'acceptabilité des résultats d'analyse (cf. NF EN ISO 15189).

Bibliographie / Sources :

Loi :

- **Code de la Santé Publique :**
 - Diagnostic préimplantatoire : art. L. 2131-4 et suivants, art. R2131-22-1 à R2131-40
 - Aide Médicale à la procréation : art. L. 2141-1 et s., L. 2162-1 et s. et R. 2141-1 et s.

Arrêtés :

- **Règles de bonnes pratiques AMP** (arrêté du 30 juin 2017 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008)
- **Règles de bonnes pratiques des CPDPN** (arrêté du 1er juin 2015)

Norme :

- **ISO 15189:2012.** Laboratoires de biologie médicale — Exigences concernant la qualité et la compétence

Recommandations / avis :

- **The Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS): Guidelines for good practice in PGD.** Preimplantation Genetic Diagnosis International Society. *Reprod Biomed Online*. 2004 Oct;9(4):430-4.
- **Recommandations ESHRE :**
 - **ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations.** ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group, Coonen E, Rubio C, Christopikou D, Dimitriadou E, Gontar J, Goossens V, Maurer M, Spinella F, Vermeulen N, De Rycke M. *Hum Reprod Open*. 2020 May 29;2020(3):hoaa017. doi: 10.1093/hropen/hoaa017. eCollection 2020.
 - **ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT.** ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho F, Coonen E, Goossens V, Kokkali G, Rubio C, Meijer-Hoogeveen M, Moutou C, Vermeulen N, De Rycke M. *Hum Reprod Open*. 2020 May 29;2020(3):hoaa021. doi: 10.1093/hropen/hoaa021. eCollection 2020.
 - **ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT.** ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group, Kokkali G, Coticchio G, Bronet F, Celebi C, Cimadomo D, Goossens V, Liss J, Nunes S, Sfontouris I, Vermeulen N, Zakharova E, De Rycke M. *Hum Reprod Open*. 2020 May 29;2020(3):hoaa020. doi: 10.1093/hropen/hoaa020. eCollection 2020.
- **PGDIS Position Statement on the Transfer of Mosaic Embryos 2019.** Cram DS, Leigh D, Handyside A, Rechitsky L, Xu K, Harton G, Grifo J, Rubio C, Fragouli E, Kahraman S, Forman E, Katz-Jaffe M, Tempest H, Thornhill A, Strom C, Escudero T, Qiao J, Munne S, Simpson JL, Kuliev A. *Reprod Biomed Online*. 2019 Aug;39 Suppl 1:e1-e4. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.06.012.

ANNEXES

ANNEXE 1 : EVALUATION DE LA RÉOLUTION OBTENUE

A. EXEMPLE DE CRITERES UTILISES POUR EVALUER LA QUALITÉ DES BANDES G

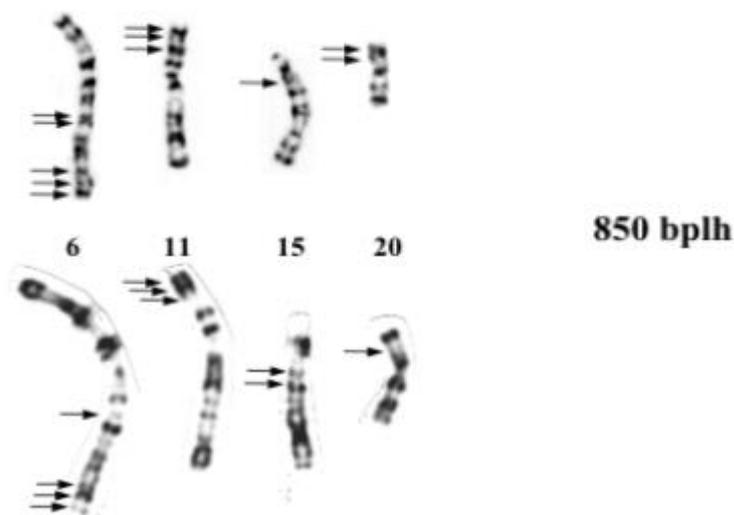
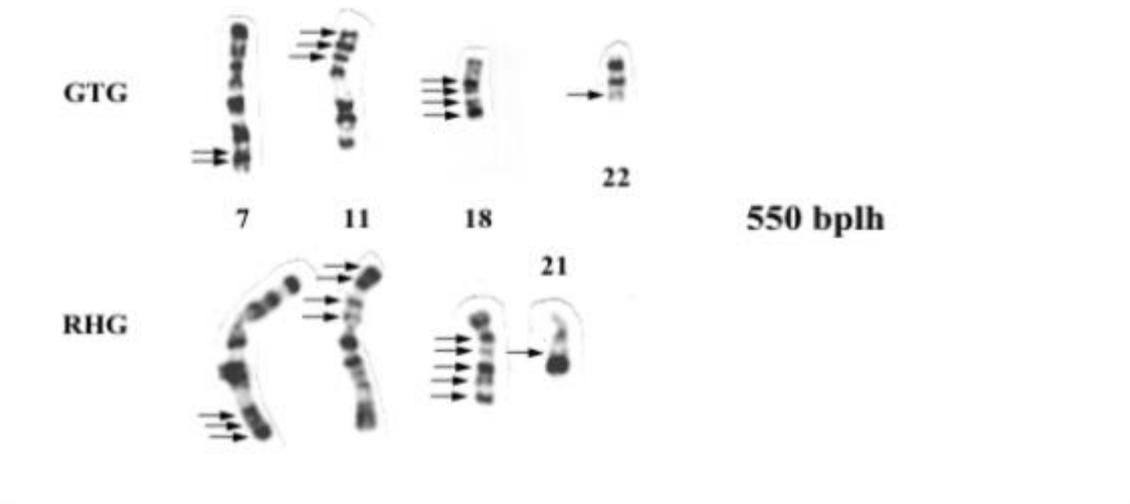
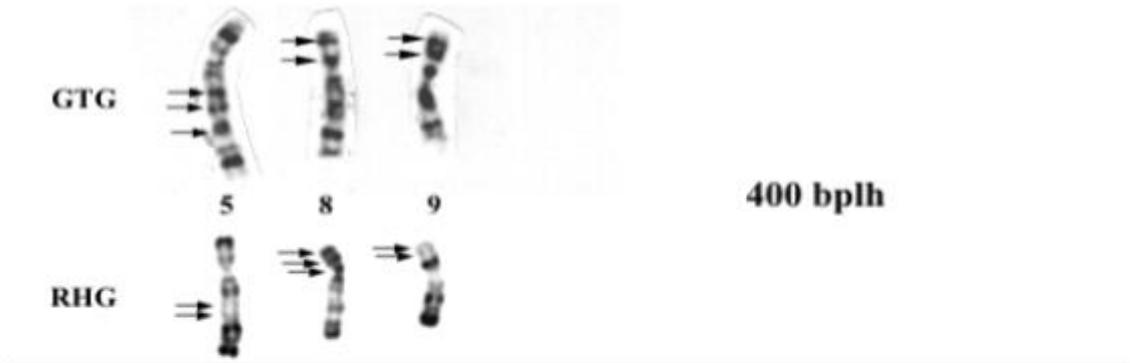
Qualité du marquage	Valeur correspondante	ISCN	Bandes identifiées
Pas de bandes			Très peu de bandes rendant impossible un classement non équivoque
Médiocre	Environ 150 bandes par set haploïde.		Pas de fins détails, mais chaque chromosome est identifié sur la base des bandes servant de bornes. Par exemple le 4 est distingué du 5 ou le 8 du 9.
Assez bonne	Environ 400 bps.		Deux bandes sombres distinctes sur le 8p et sur le 9p, et trois bandes sombres distinctes au milieu du 5q (5q14, 5q21, 5q23).
Bonne	Environ 550 bps.		Quatre bandes sombres distinctes sur le 18q et trois sur le 11q. 7q33 et 7q35 sont séparées et 22q13.2 doit être visible.
Excellente	Environ 850 bps		6q16 doit être subdivisée. 6q24, 6q25.2 et 6q26 apparaissent comme 3 bandes distinctes. 11p14.1 est séparée de 11p14.3. 15q12 est distincte et il y a deux bandes sombres distinctes sur le 20p.

[Modifié d'après : The Journal of the Association of Genetic Technologists 24 (4) p118, 1998]

B. MODÈLES DE RÉOLUTION EN BANDES G ET R (DR MARGUERITE PRIEUR)

Deux des 3 critères proposés sont nécessaires afin d'estimer le niveau de résolution à 400 bandes.

Trois des 4 critères proposés sont nécessaires afin d'estimer le niveau de résolution à 550 ou 850 bandes.



C. NIVEAU DE RÉOLUTION SOUHAITABLE EN FONCTION DES INDICATIONS

Postnatal : il est souhaitable d'arriver à une résolution de 550 bandes

Un minimum de 400 bandes est requis, sinon un deuxième prélèvement est recommandé sauf en cas d'anomalie de nombre concordante avec la clinique (ex : trisomie 21) ou une ACPA réalisée par ailleurs.

Prénatal (Liquide amniotique et Villosités choriales) : 400 bandes minimum

Si la qualité obtenue ne permet pas d'obtenir la résolution minimale requise, le rapport doit le mentionner.

ANNEXE 2 : INDICATIONS DU CARYOTYPE ET DE L'ACPA EN CYTOGÉNÉTIQUE CONSTITUTIONNELLE POSTNATALE

INDICATIONS DU CARYOTYPE CONSTITUTIONNEL EN PREMIÈRE INTENTION PLUS OU MOINS ASSOCIÉ À DE LA FISH

Patient avec :

- phénotype évocateur d'un syndrome chromosomique connu : trisomies 21, 13, 18, délétions 4p, 5p, syndromes de Turner (45,X), de Klinefelter (47,XXY), DSD
- petite taille chez la fille
- retard ou absence de puberté
- suspicion de syndrome d'instabilité chromosomique
- maladie récessive liée à l'X chez la fille
- aménorrhée primaire ou secondaire, insuffisance ovarienne précoce
- azoospermie ou oligospermie sévère

Couple avec :

- diagnostic prénatal d'une anomalie chromosomique ou d'un variant inhabituel
- avortements spontanés à répétition, échecs d'implantation à répétition
- enfant décédé suspect d'anomalie chromosomique
- stérilité du couple - bilan avant assistance médicale à la procréation

Antécédents familiaux :

- d'anomalie chromosomique connue
- d'apparenté suspect d'anomalie chromosomique, mais non disponible pour l'analyse
- récurrence d'une association mort fœtale / malformations dans des branches collatérales

Divers :

- vérification ou complément d'un diagnostic prénatal
- vérification ou complément d'un diagnostic postnatal
- recherche d'anomalie chromosomique limitée aux fibroblastes

INDICATIONS POUR LESQUELLES UNE ACPA DOIT ÊTRE ENVISAGÉE EN PREMIÈRE INTENTION

- hypotonie néonatale
- Déficience Intellectuelle (DI) syndromique / DI non syndromique
- retard de croissance intra-utérin et dysmorphie, anomalie neurologique, syndrome polymalformatif sans DI
- troubles du comportement, troubles du spectre autistique
- enfant mort né, foetopathologie
- Signe d'appel échographique en prénatal

ANNEXE 3 : EXCLUSION DES MOSAÏQUES

POURCENTAGE DE MOSAÏQUE EXCLU AVEC UN DEGRÉ DE CONFIANCE DE 0,90, 0,95, ET DE 0,99 SI L'ON EXAMINE LE NOMBRE SPÉCIFIÉ DE CELLULES ET SI ELLES ONT TOUTES UN CARYOTYPE IDENTIQUE

D'après: Exclusion of Chromosomal Mosaicism: Tables of 90%, 95%, and 99% Confidence Limits and Comments on Use. HOOK E. B. *Am J Hum Genet* 29; 94-97. 1977

Nombre de cellules (n)	Degré de confiance			Nombre de cellules (n)	Degré de confiance		
	0.90	0.95	0.99		0.90	0.95	0.99
< 4				36	7%	8%	13%
5	38%			37	7%	8%	12%
6	32%	41%		38	6%	8%	12%
7	29%	35%		39	6%	8%	12%
8	26%	32%	46%	40	6%	8%	11%
9	23%	29%	41%	41	6%	8%	11%
10	21%	26%	37%	42	6%	7%	11%
11	19%	24%	35%	43	6%	7%	11%
12	18%	23%	32%	44	6%	7%	10%
13	17%	21%	30%	45	5%	7%	10%
14	16%	20%	29%	46	5%	7%	10%
15	15%	19%	27%	47	5%	7%	10%
16	14%	18%	26%	48	5%	7%	10%
17	13%	17%	24%	49	5%	6%	9%
18	13%	16%	23%	50-55	5%	6%	9%
19	12%	15%	22%	56	5%	6%	8%
20	11%	14%	21%	57-58	4%	6%	8%
21	11%	14%	20%	59-63	4%	5%	8%
22	10%	13%	19%	64-73	4%	5%	7%
23	10%	13%	19%	74	4%	4%	7%
24	10%	12%	18%	75	4%	4%	6%
25	9%	12%	17%	76-89	3%	4%	6%
26	9%	11%	17%	90-98	3%	4%	5%
27	9%	11%	16%	99-112	3%	3%	5%
28	8%	11%	16%	113	3%	3%	4%
29	8%	10%	15%	114-148	2%	3%	4%
30	8%	10%	15%	149-151	2%	2%	4%
31	8%	10%	14%	152-227	2%	2%	3%
32	7%	9%	14%	228-229	2%	2%	2%
33	7%	9%	14%	230-298	1%	2%	2%

34	7%	9%	13%		299-458	1%	1%	2%
35	7%	9%	13%		>459	1%	1%	1%

Nota bene - Si n est le nombre de cellules comptées sans biais, alors le pourcentage de mosaïque (ou un pourcentage plus grand) qui est exclu avec le degré de confiance voulu apparaît dans la colonne appropriée. Par exemple, si 52 cellules sont examinées sans détecter de mosaïque, alors le plus bas niveau de mosaïque, exclu avec 95% de confiance, est de 6%. D'autre part, puisque 50% est le plus grand pourcentage de mosaïque possible, l'examen de 52 cellules sans détection de mosaïque exclut, avec un degré de confiance d'au moins 95%, un pourcentage de mosaïque compris entre 50% et 6% inclus. Il n'exclut pas un niveau de mosaïque de 5% ou moins avec un degré de confiance de 95%. Pour déterminer quel nombre de cellules il faut compter pour exclure un niveau donné de mosaïque, par exemple 10% ou plus, il faut choisir la plus basse valeur de n pour laquelle 10% apparaît dans la colonne appropriée. Dans ce cas, il faut compter 22 cellules pour un degré de confiance à 90%, 29 cellules pour un degré de confiance à 95%, 44 cellules pour un degré de confiance à 99%.

ANNEXE 4 : STRATÉGIE D'ÉTUDE D'UNE MOSAÏQUE EN PRÉNATAL

CRITÈRES DE DIAGNOSTIC D'UNE MOSAÏQUE SUR LES CELLULES AMNIOTIQUES

d'après L.Y.F. HSU et al

Références :

Proposed guidelines for diagnosis of chromosomal mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies.

Hsu L.Y.F. et al *Prenat. Diagn*,12, 555-573, 1992

Revised guidelines for the diagnosis of mosaicism in amniocytes

Hsu L.Y.F., Benn P.A. *Prenat Diagn*,19,1081-1082, 1999

Critère minimum : une ou plusieurs cellules ou colonies avec une même anomalie dans deux récipients de culture différents.

Principe

D'après Hsu, une mosaïque vraie est définie par la présence de la même anomalie chromosomique dans 2 flacons de culture différents.

La découverte d'une cellule avec une anomalie chromosomique nécessite, selon l'anomalie retrouvée, une étude extensive de 12 ou 24 cellules dans les autres flacons de culture. Si l'anomalie n'est pas retrouvée, alors il sera possible d'exclure une mosaïque vraie et de conclure à une pseudo-mosaïque.

Le compte des cellules se fait de la façon suivante :

- 1 clone in situ correspond à 1 cellule
- L'étude après trypsine part du principe que 60% des mitoses examinées sont étudiées à partir de clones différents. Par conséquent, 1 mitose = 0,6 cellule avec un maximum de cellules étudiées correspondant au nombre de clones initial dans le flacon.

DÉMARCHE DIAGNOSTIQUE

Le diagnostic d'une mosaïque se fait en deux étapes, l'étape de routine et une étude complémentaire de niveau modéré ou approfondi. Dans quelques cas, l'étude complémentaire n'est pas nécessaire. Le nombre de cellules supplémentaires à examiner dépend de la viabilité de l'anomalie détectée sur une cellule. **(voir le tableau)**

Première étape, en routine

- **Un minimum de 2 flacons ou récipients de culture par spécimen.**
- **12 clones in situ ou 15 mitoses après trypsine, issus de deux sources différentes sont examinés**

Deuxième étape : étude complémentaire (en fonction de l'anomalie, cf tableau ci-dessous)

- Niveau modéré

Rechercher 12 cellules complémentaires dans les autres cultures

- Niveau approfondi

Rechercher 24 cellules complémentaires dans les autres cultures.

Etude complémentaire non nécessaire

Vérifier dans toutes les cellules à la première étape que l'anomalie en question n'est pas présente

Attitude en fonction des chromosomes concernés

Technique par trypsination	Technique in situ
<p><u>ETUDE COMPLÉMENTAIRE APPROFONDIE</u></p> <p>Trisomies 2, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22 (une ou plusieurs cellules) Anomalie déséquilibrée de la structure (plusieurs cellules) Chromosome marqueur (plusieurs cellules)</p>	<p><u>ETUDE COMPLÉMENTAIRE APPROFONDIE</u></p> <p>Trisomies 2, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22 (une ou plusieurs colonies) Anomalie déséquilibrée de la structure (plusieurs colonies) Chromosome marqueur (plusieurs colonies)</p>
<p><u>ETUDE COMPLÉMENTAIRE MODÉRÉE</u></p> <p>Polygonosomies (une ou plusieurs cellules) Trisomies 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 17, 19 (une ou plusieurs cellules) 45, X (plusieurs cellules) Monosomie pour un autosome (plusieurs cellules) Chromosome marqueur (une cellule) Anomalie équilibrée de la structure (plusieurs cellules)</p>	<p><u>ETUDE COMPLÉMENTAIRE MODÉRÉE</u></p> <p>Polygonosomies (une ou plusieurs colonies) Trisomies 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 17, 19 (une ou plusieurs colonies) 45, X (une ou plusieurs colonies) Monosomie pour un autosome (une ou plusieurs colonies) Chromosome marqueur (une colonie) Anomalie équilibrée de la structure (plusieurs colonies) Anomalie déséquilibrée de la structure (une colonie)</p>
<p><u>PAS D'ÉTUDE COMPLÉMENTAIRE</u></p> <p><u>Anomalie équilibrée de la structure (une colonie)</u> <u>Cassure centromérique avec perte d'un bras (une colonie)</u> <u>Toutes les anomalies d'une cellule unique</u></p>	<p><u>PAS D'ÉTUDE COMPLÉMENTAIRE</u></p> <p>45,X (une cellule) Anomalie déséquilibrée de la structure (une cellule) Anomalie équilibrée de la structure (une cellule) Cassure centromérique avec perte d'un bras (une cellule) pas d'étude complémentaire Anomalie équilibrée de la structure (une colonie) Cassure centromérique avec perte d'un bras (une colonie) Toutes les anomalies d'une cellule unique</p>

Guide modifié pour l'exploration d'une suspicion de mosaïque amniotique (Hsu LYF et al 1999)

ANNEXE 5 : RECOMMANDATIONS POUR LA MISE EN CULTURE DES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES SELON LE TYPE D'HÉMOPATHIE

La nature du tissu à analyser ainsi que les conditions de culture par type de pathologie sont indiquées dans le tableau ci-après, donné à titre indicatif. Les conditions de cultures peuvent être adaptées en fonction de la richesse et du jour d'arrivée de l'échantillon, selon les pratiques validées par le laboratoire. Par sécurité, faire si possible 2 flacons de culture.

Pathologie	Echantillon	Nombre de cellules / ml à ensemercer	Facteurs de croissance ou mitogènes	Durée de culture
Leucémies aiguës myéloïdes	moelle osseuse, sang blastique	0,5 à 2.10 ⁶	G-CSF* possible	J1 à J2, voire J3-J4 LAM3 jamais <J1
Leucémies aiguës lymphoblastiques	moelle osseuse, sang blastique	0,5 à 2.10 ⁶		J1, avec ou sans colchicine, voire J2
Syndromes myéloprolifératifs et LMC	moelle osseuse, en cas d'impossibilité : sang si myélémie suffisante	0,5 à 2.10 ⁶	G-CSF* possible	J1 à J2, voire J3-J4
Syndromes myélodysplasiques	moelle osseuse	0,5 à 2.10 ⁶	G-CSF* possible	J1 à J2, voire J3-J4
Syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (LLC/LL, MW, LM, LZM, autre)	sang, moelle osseuse	1 à 2.10 ⁶	ODN/IL2	J2 à J4
Lymphomes B (sans autre indication, ou lymphome B agressif)	ganglion, rate, autre biopsie tissulaire	0,5 à 15.10 ⁶ ou pas de numération si exigüe	ODN/IL2 possible	J1, +/- J2 à J4 avec ODN/IL2**
	sang, moelle osseuse, autre liquide de ponction	1 à 2.10 ⁶	ODN/IL2 possible	J1, +/- J2 à J4 avec ODN/IL2**
Lymphomes ou syndromes lymphoprolifératifs chroniques T	ganglion, rate, autre biopsie tissulaire	0,5 à 15.10 ⁶ ou pas de numération si exigü	PHA possible	J1 et/ou J2 à J4 avec PHA

sang, moelle osseuse, autre liquide de ponction	1 à 2.10 ⁶	PHA possible	J1 et/ou J2 à J4 avec PHA
---	-----------------------	--------------	------------------------------

* et autres facteurs de croissance myéloïdes comme le surnageant de la lignée 5637, en particulier si prélèvement pauvre et/ou culture prolongée à J3/J4.

** dans le cas du lymphome de Burkitt, une culture courte sans mitogène (<24h) est indispensable. Une culture directe peut être employée pour les lymphomes agressifs, y compris lymphome de Burkitt

LLC : leucémie lymphoïde chronique, LL: lymphome lymphocytaire, MW : maladie de Waldenström, LM: lymphome du manteau, LZM: lymphome de la zone marginale, ODN: oligodéoxynucléotides

ANNEXE 6 : LISTE NON EXHAUSTIVE DES EEQ EXISTANTS EN CYTOGÉNÉTIQUE

Organisme: Association des Cytogénéticiens de Langue Française, ACLF (voir www.eaclf.org)

Nom du ou des contrôles : EEQ prénatal et postnatal rétrospectifs et prospectifs, EEQ Hématologie prospectif, EEQ ACPA postnatal prospectif, EEQ ACPA DPN prospectif
 Nombre de niveau(x) : 2 dossiers contrôle par matrice (1 dossier pour l'hématologie)
 Fréquence de passage des contrôles : 1 par an

Organisme: CAP Survey

Nom du ou des contrôles : ACMG/CAP Cytogenetics CY
 Nombre de niveau(x) : 5 métaphases par test
 Fréquence de passage des contrôles : 3 par an

Organisme : CEQA ([www. CEQA -cyto.eu](http://www.CEQA-cyto.eu))

Nom du ou des contrôles : CEQA EQA : constitutionnel et hématologie
 Nombre de niveau(x) : 2 cas par matrice
 Fréquence de passage des contrôles : 1 par an

Organisme : GenQA

Chromosome Breakage Syndromes pilot

Nombre de niveau : 1 cas de Fanconi, un cas de Bloom
 Fréquence de passage des contrôles : 1 par an

Organisme : UK NEQAS

Nom du ou des contrôles : Constitutional
 Nombre de niveau(x) : 2 à 4 cas, Amniotic Fluid, CVS, Blood/Urgent Blood or Solid Tissue, plus
 Fréquence de passage des contrôles : 2 par an
 FISH HER2 dans le sein.

AFAQAP (Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie Pathologique)
 FISH HER *dans le sein*

Partenariat entre deux laboratoires

Nom du ou des contrôles : Contrôle interlaboratoire
 Nombre de niveau(x) à définir par accord entre les laboratoires participants
 Fréquence de passage des contrôles : à définir par accord entre les laboratoires participants

EEQ pour la FISH constitutionnel

EEQ ACLF (couplé au banding classique),
 EEQ CEQAS Fréquence de passage des contrôles : 1 par an, 2 dossiers par contrôle et par tissu

